

Etablierung methodischer Grundlagen und initiale Untersuchungen zur
physiologischen Charakterisierung von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tanja Piekarski
aus Köln

1. Referentin oder Referent:
2. Referentin oder Referent:
eingereicht am:
mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professor Dr. Dieter Jahn
Privatdozent Dr.-Ing. Max Schobert
26.01.2011
13.04.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Wagner-Döbler I., Ballhausen B., Berger M., Brinkhoff T., Buchholz I., Bunk B., Cypionka H., Daniel R., Drepper T., Gerdts G., Hahnke S., Han C., Jahn D., Kalhoefer D., Kiss H., Klenk H.P., Kyrpides N., Liebl W., Liesegang H., Meincke L., Pati A., Petersen J., Piekarski T., Pommerenke C., Pradella S., Pukall R., Rabus R., Stackebrandt E., Thole S., Thompson L., Tielen P., Tomasch J., von Jan M., Wanphrut N., Wichels A., Zech H. & Simon M. The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *The ISME Journal* 4: 61-77 (2010).

Piekarski T., Buchholz I., Drepper T., Schobert M., Wagner-Doebler I., Tielen P., Jahn D. Genetic tools for the investigation of *Roseobacter* clade bacteria. *BMC Microbiol* 9: 265 (2009).

Tagungsbeiträge

Piekarski T., Tielen P. & Jahn D.: Molecular biology techniques for *Roseobacter* clade bacteria. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Bochum, Deutschland (2009).

Piekarski T., Tielen P. & Jahn D.: Development of techniques for genetic manipulation of members of the *Roseobacter* clade. (Poster) Gordon Research Conference Marine Microbes, Lucca, Italien (2008).

Für meine Mutter.

Und das Niesel.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung.....	10
1.1 Der <i>Roseobacter</i> -Cluster.....	10
1.2 <i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-12 ^T	12
1.2.1 Sekretion	14
1.2.2 Anaerober Energiemetabolismus.....	19
1.2.2.1 Denitrifikation.....	20
1.2.2.2 Arginin-Fermentation.....	22
1.2.2.3 Die Regulation des anaeroben Stoffwechsels.....	23
1.2.3 Aerob anoxygene Photosynthese.....	25
2 Zielsetzung der Arbeit.....	28
3 Material und Methoden.....	29
3.1 Geräte.....	29
3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits.....	30
3.3 Bakterienstämme und Plasmide.....	31
3.4 Medien und Medienzusätze.....	32
3.4.1 Medien für das Wachstum von <i>Escherichia coli</i> und Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	32
3.4.2 Antibiotika und Medienzusätze.....	35
3.5 Mikrobiologische Techniken.....	35
3.5.1 Sterilisation.....	35
3.5.2 Lagerung von Bakterienkulturen.....	35
3.5.3 Bakterienkultivierung auf Agarplatten.....	36
3.5.3.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	36
3.5.3.2 Kultivierung von Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	36
3.5.4 Flüssigkulturen von <i>Escherichia coli</i> und Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	36
3.5.4.1 Wachstumsbedingungen für <i>Escherichia coli</i>	36
3.5.4.2 Wachstumsbedingungen für Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	37
3.5.5 Bestimmung der Zelldichte.....	37
3.5.6 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC).....	37
3.5.7 Test der Antibiotikastabilitäten.....	38
3.6 Molekularbiologische Techniken.....	38
3.6.1 Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> ST18 Zellen.....	38
3.6.2 Transformation chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> ST18 Zellen.....	39
3.6.3 Herstellung chemokompetenter Zellen von Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	39
3.6.3.1 CaCl ₂ -kompetente Zellen von Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	39
3.6.3.2 RbCl ₂ -kompetente Zellen von Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	39
3.6.4 Transformation chemokompetenter Zellen von Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	40
3.6.5 Herstellung elektrokompenter Zellen von Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	40
3.6.6 Transformation elektrokompenter Zellen von Bakterien der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	41

3.6.7 Konjugaler Transfer von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> ST18 in Bakterien der Roseobacter-Gruppe.....	41
3.6.8 Bestimmung der Plasmidstabilitäten in Stämmen der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	42
3.6.9 Präparation von Plasmid-DNA.....	43
3.6.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	43
3.6.11 Restriktion von DNA.....	44
3.6.12 DNA-Gelelektrophorese.....	44
3.6.13 Messung der Fluoreszenzintensität von mit pRhokHi-2-FbFP transformierten Stämmen der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	45
3.6.14 Microarray-Analysen.....	45
3.6.14.1 Wachstumsbedingungen zur Präparation von <i>Dinoroseobacter shibae</i> Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen.....	45
3.6.14.2 Isolierung von Gesamtzell-RNA aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>	46
3.6.14.3 Bestimmung der Qualität von <i>Dinoroseobacter shibae</i> Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen mittels Bioanalyzer.....	47
3.6.14.4 Fluoreszenzmarkierung von <i>Dinoroseobacter shibae</i> Gesamtzell-RNA.....	47
3.6.14.5 Bestimmung der Fluoreszenzmarkierungseffizienz.....	47
3.6.14.6 Fragmentierung und Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten <i>Dinoroseobacter shibae</i> Gesamtzell-RNA.....	47
3.6.14.7 Scan von Microarrays.....	48
3.6.14.8 Auswertung von Microarray-Daten.....	48
3.7 Biochemische Techniken.....	49
3.7.1 Enzymatische Reinigung von Chitin.....	49
3.7.2 Bestimmung von extrazellulären Enzymaktivitäten mittels Substratagarplatten.....	49
3.7.2.1 Alginate-Lyase-Aktivitätsbestimmung.....	49
3.7.2.2 Chitinase-Aktivitätsbestimmung.....	50
3.7.2.3 DNase-Aktivitätsbestimmung.....	50
3.7.2.4 Elastase-Aktivitätsbestimmung.....	50
3.7.2.5 Hämolyisin-Aktivitätsbestimmung.....	50
3.7.2.6 Phospholipase A- und C-Aktivitätsbestimmung.....	51
3.7.2.7 Protease-Aktivitätsbestimmung.....	51
3.7.3 Photometrische Methoden zur Bestimmung von extrazellulären Enzymaktivitäten.....	51
3.7.3.1 Alginate-Lyase-Aktivitätsbestimmung.....	51
3.7.3.2 Alkalische Phosphatase-Aktivitätsbestimmung.....	52
3.7.3.3 Esterase-Aktivitätsbestimmung.....	53
3.7.3.4 Lipase-Aktivitätsbestimmung.....	53
3.7.3.5 Protease-Aktivitätsbestimmung.....	54
3.7.3.6 Glukose-6-Phosphatdehydrogenase Aktivitätstest.....	54
3.7.4 Methoden zur Fällung extrazellulärer Proteine aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>	55
3.7.4.1 Wachstumsbedingungen für <i>Dinoroseobacter shibae</i> zur Gewinnung extrazellulärer Proteine.....	55
3.7.4.2 Gewinnung von zellfreien Überständen von <i>Dinoroseobacter shibae</i> Kulturen für die Fällung extrazellulärer Proteine.....	55
3.7.4.3 Acetonfällung.....	55
3.7.4.4 Ammoniumsulfatfällung.....	56

3.7.4.5	Konzentrierung Ammoniumsulfat-gefällter Proteine.....	57
3.7.4.6	Chloroform-Methanol-Fällung.....	57
3.7.4.7	Hitzefällung.....	57
3.7.4.8	Polyethylenglykol (PEG)-Fällung.....	57
3.7.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	58
3.7.6	Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese	59
3.7.6.1	Pufferaustausch.....	60
3.7.6.2	Bestimmung der Konzentration von extrazellulären Proteinen aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>	60
3.7.6.3	Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung.....	60
3.7.6.4	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	61
3.7.6.5	Behandlung der pH-Gradientenstreifen für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	62
3.7.6.6	Gele für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	62
3.7.6.7	SDS-Gelelektrophorese.....	63
3.7.6.8	Entfärbung der Proben für die MALDI-TOF Analyse.....	63
3.7.6.9	Massenspektrometrie.....	64
3.7.7	Silberfärbung.....	64
3.8	Transmissions-Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	66
4	Ergebnisse und Diskussion.....	67
4.1	Ein genetisches System für Bakterien des <i>Roseobacter</i> -Clusters – Rationale des gewählten Ansatzes.....	67
4.1.1	Wachstumsverhalten von <i>Escherichia coli</i> ST18 und Stämmen der <i>Roseobacter</i> -Gruppe bei verschiedenen Salzkonzentrationen.....	68
4.1.2	Bestimmung der natürlichen Antibiotika-Resistenzen verschiedener Stämme der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	71
4.1.2.1	Untersuchung der Antibiotika-Stabilitäten.....	72
4.1.2.2	Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC).....	73
4.1.3	Transformation von Stämmen der <i>Roseobacter</i> -Gruppe.....	77
4.1.3.1	Transformation chemokompetenter Zellen von Stämmen der <i>Roseobacter</i> - Gruppe.....	77
4.1.3.2	Transformation elektrokompeter Zellen von Stämmen der <i>Roseobacter</i> - Gruppe.....	77
4.1.3.3	Transformation von Stämmen der <i>Roseobacter</i> -Gruppe mittels Konjugation.....	80
4.1.3.4	Plasmidstabilität.....	82
4.1.4	Etablierung eines Reporter-gen-Systems.....	85
4.2	Identifizierung sekretierter Proteine von <i>Dinoroseobacter shibae</i>	88
4.2.1	Qualitativer Aktivitätsnachweis sekretierter Enzyme mit Substratagarplatten.....	88
4.2.2	Photometrischer Nachweis sekretierter Proteine	92
4.2.3	Charakterisierung sekretierter Proteine von <i>Dinoroseobacter shibae</i> mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI- TOF/MS.....	96
4.2.3.1	Etablierung geeigneter Methoden zur Isolierung sekretierter Proteine aus Kulturüberständen von <i>Dinoroseobacter shibae</i>	96
4.2.3.2	Präzipitation sekretierter Proteine aus zellfreien Kulturüberständen von <i>Dinoroseobacter shibae</i>	99

4.2.3.3 2D-Gelelektrophorese der sekretierten Proteine aus <i>Dinoroseobacter shibae</i> kultiviert in SW-Medium.....	100
4.2.3.4 Sekretomanalysen von <i>Dinoroseobacter shibae</i> kultiviert mit verschiedenen Nährstoffangeboten.....	109
4.3 Der anaerobe Stoffwechsel von <i>Dinoroseobacter shibae</i> – Genexpressionsstudien	113
4.3.1 Genexpression von <i>D. shibae</i> kultiviert unter anaeroben denitrifizierenden Bedingungen.....	115
4.3.1.1 Übersicht.....	115
4.3.1.2 Gene der Denitrifikation werden stark induziert.....	116
4.3.1.3 Gene der Arginin-Fermentation werden induziert.....	121
4.3.1.4 Differentielle Expression von Genen anderer Elektronentransportketten-Enzyme.....	122
4.3.1.5 Gene des Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus werden induziert.....	123
4.3.1.6 Gene für Transportproteine.....	123
4.3.1.7 Gene der allgemeinen Stressantwort werden induziert.....	125
4.3.1.8 Gene für regulatorische Proteine.....	126
4.3.1.9 Gene für Motilität und Chemotaxis werden reprimiert.....	126
4.3.1.10 Gene der PHB-Synthese werden induziert.....	127
4.3.1.11 Gene für Typ IV-Pilus/Sekretion werden reprimiert.....	128
4.3.1.12 Gene der Translation werden reprimiert.....	128
4.3.1.13 Sonstige Gene.....	129
4.3.1.14 Unbekannte Gene.....	130
4.3.2 Genexpression von <i>D. shibae</i> kultiviert unter anaerob denitrifizierenden Bedingungen mit Licht.....	130
4.3.3 Genexpression von <i>D. shibae</i> kultiviert unter anaeroben fermentativen Wachstumsbedingungen mit 10 mM Arginin unter Lichtausschluss.....	134
4.3.3.1 Übersicht.....	134
4.3.3.2 Gene der Denitrifikation werden induziert.....	137
4.3.3.3 Gene der Arginin-Fermentation werden induziert.....	138
4.3.3.4 Differentielle Expression von Genen anderer Elektronentransportketten-Enzyme.....	138
4.3.3.5 Gene des Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus.....	139
4.3.3.6 Gene für Transportproteine.....	140
4.3.3.7 Gene der allgemeinen Stressantwort werden induziert.....	140
4.3.3.8 Gene für regulatorische Proteine.....	141
4.3.3.9 Gene für Motilität und Chemotaxis werden reprimiert.....	141
4.3.3.10 Sonstige Gene.....	141
4.3.3.11 Unbekannte Gene.....	142
4.3.4 Genexpression von <i>D. shibae</i> kultiviert unter anaeroben fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin und Licht.....	142
4.3.5 Differentiell exprimierte Gene unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 10 mM Arginin und Lichtausschluss verglichen mit dem Wachstum mit einer definierten Menge Licht.....	144
5 Zusammenfassung.....	147
6 Ausblick.....	148
7 Literaturverzeichnis.....	149

8 Danksagung.....	164
9 Anhang.....	165

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
2D	zweidimensional
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AAnP	Aerob anoxygene Photosynthese
ALA	Aminolävulinsäure
AnAnP	Anaerob anoxygene Photosynthese
Anr	<i>anaerobic regulation of arginine deiminase and nitrate reduction</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ArcA	Arginin-Deaminase aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>
ArcB	Ornithin-Carbamoyltransferase aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>
ArcC	Carbamat-Kinase aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin, (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
CARD-FISH	<i>Catalysed reporter deposition fluorescent in situ hybridisation</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-amino]-1-Propansulfat
Crp	<i>cyclic adenosine monophosphate (cAMP) receptor protein</i>
Cy3	Carbocyanin3 (Fluoreszenzfarbstoff)
Cy5	Carbocyanin5 (Fluoreszenzfarbstoff)
deion. H ₂ O	deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSP	Dimethylsulfoniumpropionat
DNA	Desoxyribonukleinsäure, (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
Dnr	<i>dissimilative nitrate respiration regulator</i>

DOL	Einbaueffizienz des Fluoreszenzfarbstoffes (<i>Degree of labeling</i>)
DTT	Dethiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
Fnr	Regulator der Fumarat and nitrat Reduktion
g	Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunde(n)
hMB	halbkonzentriertes <i>Marine Bouillon</i> (Medium)
IEF	isoelektrische Fokussierung
JGI	Joint Genome Institute
k	kilo
Kap.	Kapitel
KbE	Kolonie bildende Einheiten
l	Liter
LB	Luria Bertani (Medium)
LB+hs	Luria Bertani-Medium mit 0,85 % (w/v) Meersalz
LB+s	Luria Bertani-Medium mit 1,7 % (w/v) Meersalz
m	Meter
M	Molar
μ	Mikro
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>)
MB	<i>Marine Bouillon</i> (Medium)
Mbp	Megabasenpaare
MIC	minimale inhibitorische Konzentration (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
min	Minute(n)
mg	Milligramm

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mol	Stoffmenge
M _r	relative molekulare Masse
n	nano
NapABC	periplasmatische Nitratreduktase aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>
NirS	periplasmatische Nitritreduktase aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>
NorCB	Stickstoffmonoxid-Reduktase aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>
NosZ	Distickstoffmonoxid-Reduktase aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>
Ω	Ohm
OD _λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SW	Salzwassermedium
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
tat	<i>Twin-arginine targeting translocase</i>
TDA	Tropodithiotsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
TRAP	<i>Tripartite ATP-independent periplasmic transporter</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Unit(s)
V	Volt
v/v	Volumenanteil pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Der *Roseobacter*-Cluster

Der *Roseobacter*-Cluster umfasst eine phylogenetisch zusammenhängende Gruppe von α 3-Proteobakterien, deren 16S rRNA mehr als 89 % Identität aufweist (Buchan *et al.*, 2005). Hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften unterscheiden sich die Mitglieder jedoch teils deutlich voneinander. Bis auf wenige Ausnahmen sind die der *Roseobacter*-Gruppe zugehörigen Bakterien marin (Buchan *et al.*, 2005). Innerhalb der Weltmeere besiedeln sie eine Vielzahl von Habitaten, wie das Sediment, Meereis, Algen, marine Invertebraten, aber auch die Freiwasserzone (Buchan *et al.*, 2005; Wagner-Döbler und Biebl, 2006). Neben ihrer weiten Verbreitung in marinen Habitaten ist es nicht ungewöhnlich, dass sie innerhalb einer mikrobiellen Gemeinschaft eine der am stärksten vertretenen Gruppen bilden. So können sie bis zu 25 % der Mikroorganismen innerhalb einer mikrobiellen Gemeinschaft repräsentieren. Besonders in küstennahen Gewässern und den Polarmeeren treten sie vermehrt auf (Wagner-Döbler und Biebl, 2006). Solche mikrobiellen Gemeinschaften finden sich häufig in Form eines Biofilm adhäriert z.B. an Algen (Bruhn *et al.*, 2007).

Die heterotrophen Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe zeichnen sich durch ein ungewöhnlich breites Spektrum metabolischer Fähigkeiten aus. So sind einige Vertreter der Gruppe dazu befähigt, aerob anoxygene Photosynthese (AAnP) zu betreiben, die im weiteren Verlauf noch näher erläutert wird (Yurkov und Beatty, 1998). Ebenso wird den Mitgliedern dieser Gruppe eine wichtige Rolle im globalen Kohlenstoff- und Schwefelkreislauf zuteil, da sie Kohlenmonoxid sowie organische schwefelhaltige Verbindungen, wie das von Algen gebildete Dimethylsulfoniumpropionat (DMSP), oxidieren können (Moran *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 1999). Die Synthese von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten, wie z.B. das Antibiotikum Tropodithiotsäure (TDA), wurde ebenfalls bei einigen Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe beobachtet (Brinkhoff *et al.*, 2004; Wagner-Döbler *et al.*, 2004). Es wurde vermutet, dass die Produktion von antibakteriell wirkenden Sekundärmetaboliten den Bakterien einen Wachstumsvorteil gegenüber konkurrierenden Organismen in Biofilmen verleiht (Ramos *et al.*, 2001). Des weiteren können Bakterien dieser Gruppe aromatische Hydrocarbone abbauen, Quorum Sensing Verbindungen synthetisieren und Toxine bilden (Moran *et al.*, 2007; Wagner-

Döbler *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2007; Gram *et al.*, 2002; Boettcher *et al.*, 2000).

Darüber hinaus sind einige Vertreter des *Roseobacter*-Clusters dazu befähigt, unter anaeroben Bedingungen, wie sie z.B. in einem mikrobiellen Biofilm auf planktonischen Invertebraten oder Partikeln marinen Schnees zu finden sind, alternative Elektronenakzeptoren zu nutzen. So können die Arten *Roseobacter denitrificans* und *Dinoroseobacter shibae* unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Nitrat wachsen (Shiba, 1991; Biebl *et al.*, 2005). *D. shibae* besitzt zudem als einziger der bisher Genomsequenzierten Stämme des *Roseobacter*-Clusters das für den Arginin-Deiminase Stoffwechselweg kodierende *arcDABC*-Operon (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Außerdem können einige Bakterien dieser Gruppe Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. Trimethylamin-N-oxid (TMAO) als alternativen Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen nutzen (Ansede *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 1999; Arata *et al.*, 1992).

Einige der für diese Stoffwechselwege kodierenden Gene wurden in Mitgliedern des *Roseobacter*-Clusters auf Plasmiden lokalisiert gefunden. So trägt *Roseobacter litoralis* die für den Lichtsammelkomplex kodierenden *puf*-Gene, welche in die AAnP involviert sind, auf einem Plasmid (Pradella *et al.*, 2004). Die *nir*-Gene zur Reduktion von toxischem Nitrit sind bei *Ruegeria pomeroyi* ebenfalls auf einem Plasmid lokalisiert (Moran *et al.*, 2004). Die Lokalisation dieser Gene auf Plasmiden erlaubt möglicherweise einen schnellen Austausch der genetischen Information mit anderen Bakterien (Brinkhoff *et al.*, 2008). Diese Vielzahl physiologischer Eigenschaften, begründet in einer hohen genetischen Diversität, scheint einer der Hauptgründe für die weite Verbreitung und hohe Anpassungsfähigkeit der Mitglieder des *Roseobacter*-Clusters zu sein.

Interessant für die Untersuchung ökologischer Adaptionsprozesse ist die *Roseobacter*-Gruppe vor allem aus dem Grund, dass sie die einzige weit verbreitete Gruppe mariner Bakterien ist, die viele kultivierbare Mitglieder enthält, welche eine relativ nahe Verwandtschaft zu den Sequenzen von unkultivierbaren Vertretern aus marinen Metagenom-Bibliotheken zeigen (Buchan *et al.*, 2005; Giovannoni und Stingl, 2005; Wagner-Döbler *et al.*, 2005). Die *Roseobacter*-Gruppe umfasst derzeit 45 beschriebene Gattungen, von fünf ihrer kultivierbaren Arten liegt das Genom vollständig sequenziert, von weiteren 27 in Rohfassung vor (<http://www.roseobase.org/>; <http://rosy.tu-bs.de/>; Newton *et al.*, 2010). Durch die stetig steigende Anzahl vollständig sequenzierter Genome

bietet sich die Möglichkeit, die genetischen Adaptionsprozesse sowie die Evolution dieser Bakteriengruppe genauer zu analysieren. Hierbei bieten die durch Untersuchungen von kultivierbarer Arten erhaltenen Kenntnisse die Möglichkeit, die ökologische Bedeutung dieser Bakterien zu charakterisieren.

1.2 *Dinoroseobacter shibae* DFL-12^T

Das marine Bakterium *D. shibae* ist eine dem *Roseobacter*-Cluster zugehörige Art innerhalb der Familie der *Rhodobacteraceae*. Charakteristisch für dieses kokken- oder eiförmige Bakterium ist seine auffällige Pigmentierung, hervorgerufen durch das Carotinoid Spheroidenon. Flüssigkulturen von *D. shibae*, die mit wenig Licht oder unter Lichtausschluss kultiviert wurden, sind pink- bis rosafarben, während beleuchtet inkubierte Kulturen blass beige gefärbt sind. *D. shibae* kann über ein Temperaturspektrum von 15 bis 38 °C wachsen, wobei das Temperaturoptimum bei 33 °C liegt, das pH-Optimum bei 6,5 bis 8,8. Die Art ist strikt salzabhängig. Für das Wachstum wird ein Salzgehalt von mindestens 1 % (w/v) benötigt. Wachstum ist bis zu einer Salinität von 7 % (w/v) möglich, was der doppelten durchschnittlichen Salzmenge von Meerwasser entspricht. Zusätzlich besteht ein essentieller Bedarf an den Wachstumsfaktoren Biotin, Nikotinsäure und 4-Aminobenzoessäure. Wie alle dem *Roseobacter*-Cluster zugehörigen Arten, besitzt auch *D. shibae* ein breites Spektrum an organischer Substanzen, welche als Kohlenstoffquelle genutzt werden können. Dazu gehören Acetat, Succinat, Fumarat, Laktat, Citrat, Glutamat, Pyruvat, Fruktose und Glycerol. Innerhalb der Gruppe der α -Proteobakterien besteht, basierend auf 16S rRNA Sequenzhomologien, die phylogenetisch engste Verwandtschaft zu den Arten *Jannaschia helgolandis*, *Ruegeria atlantica* und *Rhodobacter veldkampii*. Die Homologien der 16S rRNA Gensequenzen betragen hierbei zwischen 93,4 und 94,1 %. Mit einem GC-Gehalt von 64,8 mol% hebt sich *D. shibae* deutlich von der Gattung *Roseobacter* ab, für welche GC-Gehalte von 56,7 bis 59,6 mol% beschrieben wurden (Biebl *et al.*, 2005).

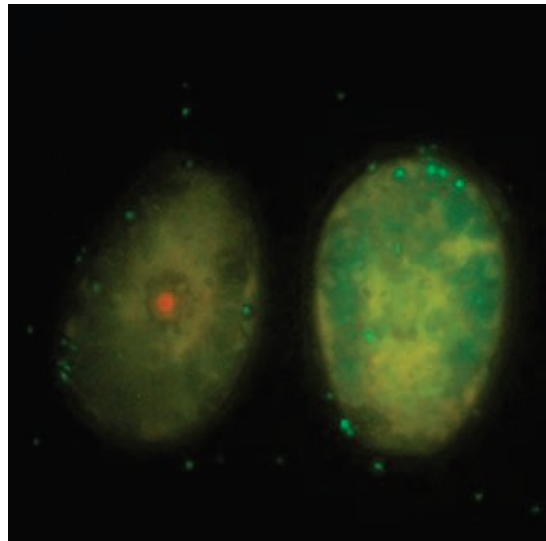


Abbildung 1: Anheftung von *D. shibae* DFL-12^T an den Dinoflagellaten *Prorocentrum lima*. Die Aufnahme der *Catalysed reporter deposition fluorescent in situ hybridisation* (CARD-FISH) mit *D. shibae* DFL12^T spezifischen 16S rRNA Sonden zeigt *D. shibae* DFL12^T Zellen (erkennbar als grüne Punkte) an die Oberfläche des Dinoflagellaten angeheftet. (Wagner-Döbler *et al.*, 2010)

D. shibae wurde bereits mehrfach mit Dinoflagellaten assoziiert vorgefunden, und von diesen isoliert. Da es sich hierbei um phylogenetisch sehr unterschiedliche Arten handelt, ist diese Symbiose nicht wirtsspezifisch (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Auch ist die Art der Symbiose nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass *D. shibae* Cobalamin synthetisieren kann, welches freigesetzt und von für Cobalamin auxotrophe Dinoflagellaten aufgenommen wird. Ob der Dinoflagellat hierbei jedoch von der Symbiose abhängig ist, ist unwahrscheinlich, da die benötigten Mengen Cobalamin sehr gering sind und ihr Bedarf möglicherweise durch im Meerwasser enthaltene Mengen gedeckt werden kann (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). *D. shibae* profitiert von der Symbiose durch Nährstoffe, die vom Dinoflagellaten freigesetzt werden, wie z.B. Produkte der Photosynthese. Es wurde postuliert, dass *D. shibae* auch tote Zellen dieser Mikroalge verwerten oder möglicherweise sogar eine parasitäre Lebensweise einschlagen kann (Wagner-Döbler *et al.*, 2010).

Der Typstamm *D. shibae* DFL-12^T wurde von kultivierten Zellen des toxischen Dinoflagellaten *Prorocentrum lima* isoliert (Biebl *et al.*, 2005). Das 4,4 Mbp große Genom von *D. shibae* DFL-12^T wurde vollständig von dem Joint Genome Institute (JGI) sequenziert und besitzt 4.198 für Proteine kodierende Gene. Für 28 % dieser

vorhergesagten Genprodukte konnte keine Funktion vorhergesagt werden (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Das sequenzierte Genom von *D. shibae* DFL-12^T weist viele wichtige Merkmale auf, welche bereits für andere Arten des *Roseobacter*-Clusters beschrieben (Kap. 1.1) und deren dafür kodierenden Gene ebenfalls in bereits sequenzierten Isolaten identifiziert wurden. So weist das Genom unter anderem darauf hin, dass *D. shibae* in der Lage ist, aerobe anoxygene Photosynthese zu betreiben, Kohlenmonoxid, organische Schwefelverbindungen sowie Aromaten abzubauen und unter anaeroben Bedingungen mittels Denitrifikation oder Arginin- oder Pyruvat-Fermentation zu leben (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Diese und eine Vielzahl weiterer Merkmale wie die Symbiose mit Dinoflagellaten oder die Produktion neuartiger Quorum Sensing Verbindungen machen *D. shibae* DFL-12^T zu einem ideal geeigneten Modellorganismus, um die hohe Anpassungsfähigkeit des *Roseobacter*-Clusters an unterschiedliche Habitate zu untersuchen.

1.2.1 Sekretion

Eine Vielzahl von Bakterien sekretiert Proteine. Die Gesamtheit aller sich außerhalb der inneren Zellmembran befindlichen Proteine wird hierbei als Sekretom definiert. Neben den Ectoproteinen, bestehend aus im Periplasma lokalisierten Proteinen bei Gram-negativen Bakterien und solchen, die Oberflächen-assoziiert außerhalb der Zelle vorliegen, zählen dazu die Exoproteine, welche losgelöst von der Zelle im extrazellulären Raum vorliegen (Evans *et al.*, 2007). Die sekretierten Proteine haben hierbei verschiedene Funktionen. So dienen sie zur Hydrolyse von Makromolekülen wie z.B. Proteinen, Nukleinen oder Polysacchariden zu Mono- oder Oligomeren, welche dadurch der Zelle zur Nahrungsaufnahme zur Verfügung stehen (Hoppe *et al.*, 1988; Chróst *et al.*, 1989). Die Sekretion von toxischen Produkten kann einen Wachstumsvorteil gegenüber potentiellen Konkurrenten vermitteln und vor Feinden schützen. Sekretierte Proteine sind außerdem für die Virulenz von Bakterien sowie der Zell-Zell-Kommunikation wichtig (Evans *et al.*, 2007).

Für Gram-negative Bakterien sind bisher sechs Sekretionssysteme bekannt, welche im Folgenden kurz erläutert werden.

Typ I-Sekretionssystem

Typ I-Transporter ermöglichen den direkten Transport von Proteinen über die innere und äußere Membran in einem einzigen Schritt (Milton und Saier, 2006). Diese Exporter bestehen aus einem in der inneren Membran lokalisierten *ATP-binding cassette*- (ABC) Transporter, welcher durch Hydrolyse von ATP-Molekülen Energie für den Transportprozess zur Verfügung stellt. Desweiteren bildet ein in der äußeren Membran lokalisierter Außenmembranfaktor (*outer membrane factor*; OMF) Poren in derselben. Der ABC-Transporter und der OMF werden über ein periplasmatisches Membranfusionsprotein (MFP) miteinander verbunden, so dass ein Sekretionsapparat entsteht, der sowohl innere als auch äußere Membran durchspannt (Tseng *et al.*, 2009). Für den Transport über das Typ I-Sekretionssystem benötigen die Proteine eine Signalsequenz, die C-terminal lokalisiert ist und während der Sekretion nicht abgetrennt wird (Delepelaire, 2004).

Typ II-Sekretionssystem

Der Transport von Proteinen mittels des Typ II-Sekretionssystems erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Für den Transport des Proteins über die innere Membran in das Periplasma wird entweder der *general export pathway* mit Hilfe des Sec-Apparates genutzt oder die *twin-arginine targeting translocase*- (Tat) vermittelte Sekretion (Milton und Saier, 2006). Der Sec-Apparat transportiert ATP-abhängig entfaltete Proteine durch die innere Membran. Der Tat-Weg schleust dagegen gefaltete, zum Teil mit Kofaktoren versehene Proteine aus. Beiden gemeinsam ist eine N-terminale Leitsequenz, die die Spezifität für eines der Systeme vermittelt und nach dem Transport entfernt wird. Typisch ist dabei die Präsenz von zwei Argininresten beim Tat-Weg. Der Hauptteil extrazellulärer Proteine wird über diese beiden Wege exportiert. Im Periplasma erfolgt die Modifikation des Proteins, wie z.B. die Bildung von Disulfidbrücken. Im Anschluss wird das modifizierte Protein in einem zweiten unabhängigen Schritt über die äußere Membran transportiert. Der dafür benötigte Sekretionsapparat beinhaltet sowohl eine aus 12-15 Sekretin-Untereinheiten aufgebaute Translokationspore, als auch weitere 11-14 konservierte Komponenten, welche in die Verankerung der Translokationspore mit der inneren Membran involviert sind. Diese konservierten Komponenten beinhalten integrale Untereinheiten der inneren Membran,

Pseudopilin-Unterheiten, welche das Periplasma durchspannen, und intrazelluläre ATPasen, die wahrscheinlich Energie zur Verfügung stellen, um die Pore zu öffnen und zu schließen (Tseng *et al.*, 2009). Die Struktur des Innenmembrankomplexes und des Pseudopilins ähnelt sehr stark dem Typ IV-Sekretionssystem, welcher Typ IV-Pili an die Zelloberfläche befördert, was einen gemeinsamen evolutionären Ursprung vermuten lässt (Filloux, 2004; Cianciotto, 2005).

Typ III-Sekretionssystem

Ebenso wie das Typ I-Sekretionssystem ist das Typ III-Sekretionssystem ein System, welches in einem einzigen Schritt das Protein über die innere und äußere Membran transportiert. Dieses System wird in Gram-negativen Bakterien gefunden, welche mit Tier- oder Pflanzenzellen interagieren, sei es als Pathogene oder als Mutualisten. Der Sekretionsapparat des Typ III-Sekretionssystems ist aus einer Reihe basaler Ringe, welche die innere und äußere Membran durchspannen, aufgebaut. Verbunden sind diese Ringe mit einer Art Hohnadel, durch welche das zu transportierende Protein in das Cytosol der eukaryotischen Wirtszelle injiziert wird. Weiterhin besitzt das System eine Translokationspore, die mit der Wirtszelle interagiert. Die für den Transport von Proteinen benötigte Energie wird durch ATPasen zur Verfügung gestellt. Das Typ III-Sekretionssystem hat vermutlich den gleichen evolutionären Ursprung wie die Flagelle (Tseng *et al.*, 2009).

Typ IV-Sekretionssystem

Neben dem Transport von Proteinen besitzt das Typ IV-Sekretionssystem außerdem die Fähigkeit, Nukleinsäuren zu transportieren. Der Transport wird durch einen direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt. Hierbei können Proteine und Nukleinsäuren sowohl in andere Bakterienzellen als auch eukaryotische Zellen transportiert werden (Tseng *et al.*, 2009). Der Typ IV-Sekretionsapparat besteht aus periplasmatischen und in der Membran lokalisierten Proteinen, die eine Art Pore bilden (Milton und Saier, 2006).

Typ V-Sekretionssystem

Es gibt drei Untergruppen von Proteinen, die über Typ V-Sekretion transportiert werden. Proteine, die mittels dieses Weges aus der Zelle transportiert werden, besitzen N-terminal ein Signalpeptid, welches den Transport über die innere Membran in das Periplasma über den Sec-Apparat ermöglicht. Die erste Untergruppe von Proteinen trägt N-terminal eine sogenannte *Passenger* Domäne und C-terminal eine konservierte Domäne, welche eine β -Fass Struktur bildet. Dieses β -Fass kann in die äußere Membran inseriert werden, so dass im Anschluss die *Passenger* Domäne des Proteins in den extrazellulären Raum transportiert oder in die äußere Membran integriert werden kann. Möglicherweise ist an diesem Prozess ein Helferprotein beteiligt, welches den Transport erleichtert. Die zweite Unterklasse von Proteinen bilden trimere Proteine, welche alle gemeinsam eine β -Fass Struktur bilden. In der dritten Unterklasse trägt ein Protein die β -Fass Domäne, während ein zweites das zu transportierende Protein darstellt (Tseng *et al.*, 2009).

Typ VI-Sekretionssystem

Dieses vor kurzem entdeckte Sekretionssystem ist ähnlich aufgebaut wie die Typ III- und Typ IV-Sekretionssysteme. Genauso wie bei diesen beiden Systemen können Proteine in die Wirtszelle injiziert werden. Das Typ VI-Sekretionssystem wird von pathogenen Bakterien wie z.B. *Vibrio cholerae* während des Infektionsprozesses benötigt. Ein Modell beschreibt einen das Periplasma von der inneren zur äußeren Membran durchspannenden Kanal sowie ein Poren-formendes Protein, welches mit der Wirtszelle interagiert. Die Energie, die für den Transport benötigt wird, wird von cytoplasmatischen Chaperonen mit ATPase Aktivität bereitgestellt (Tseng *et al.*, 2009).

Membranvesikel

Zusätzlich zu diesen sechs Sekretionsmechanismen besitzen Gram-negative Bakterien mit der Bildung von Membranvesikeln einen weiteren, unspezifischen, Sekretionsmechanismus. Durch die Abschnürung von Bereichen der äußeren Membran, können so Makromoleküle wie DNA und Proteine aus dem periplasmatischen Raum aus der Zelle transportiert werden (Kulp und Kuehn, 2010).

Für eine Vielzahl von Bakterien besonders für solche, die bekanntermaßen in hohem Maße Proteine sekretieren (wie z.B. *Bacillus subtilis*), existieren bereits Sekretomstudien (Rosenkrands *et al.*, 2000; Antelmann *et al.*, 2001). Dem gegenüber steht bisher erst eine bekannte Veröffentlichung über das Sekretom eines marinen Bakteriums, nämlich für *Pseudoalteromonas tunicata* (Evans *et al.*, 2007). Dabei sind sekretierte Proteine, wie z.B. hydrolytische Exoenzyme, ein charakteristisches Merkmal mariner Bakterien (Hollibaugh und Azam 1983; Hoppe, 1983; Somville und Billen, 1983; Ammerman und Azam, 1985; Martinez *et al.*, 1996). Bakterien, die in marinen Biofilmen wie z.B. auf Algen oder marinem Schnee leben, zeigen eine verstärkte Produktion dieser sekretierten Enzyme als planktonisch vorkommende (Karner und Herndl, 1992; Smith *et al.*, 1992; Grossart *et al.*, 2006). Das Leben in solch einer bakteriellen Gemeinschaft kann in Bezug auf die Nahrungsaufnahme von Vorteil sein. Da das Spektrum an sekretierbaren, hydrolytischen Enzymen je nach Organismus nur limitiert ist, ist eine einzelne Art allein nicht in der Lage, jedes komplexe Substrat zu hydrolysieren. Innerhalb einer bakteriellen Gemeinschaft hingegen stehen eine Vielzahl enzymatischer Fähigkeiten zur Verfügung, um Makromoleküle abzubauen (Martinez *et al.*, 1996). So können einige Bakterienarten der Gemeinschaft den Abbau von Makromolekülen initiieren, während andere in der Lage sind, Zwischenprodukte zu degradieren (Cotta, 1992; Helmke und Weyland, 1991). Diese synergistische Aktivität zur vollständigen Hydrolyse des Substrates ermöglicht die Aufnahme von Hydrolyseprodukt für viele Mitglieder der Gemeinschaft. Die Sekretion von Proteinen bietet so die Möglichkeit, in einer komplexen Umwelt mit einem sich häufig ändernden Nahrungsangebot das Überleben zu sichern.

Wie bereits zuvor erwähnt, liegt *D. shibae* häufig assoziiert mit Dinoflagellaten vor. Dieser Flagellat wiederum lebt neben der freien Wassersäule und dem Sediment hauptsächlich in Biofilmen auf z.B. marinen Makroalgen, Korallen und Muscheln (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Dort werden von den Makroalgen und den Flagellaten Substrate freigesetzt, die während der Photosynthese entstehen. Diese freigesetzten Substrate dienen, ebenso wie von toten Algenzellen freigesetzte Substrate, als Nährstoffe für die bakterielle Gemeinschaft innerhalb des Biofilms.

Fast 25 % der Gene von *D. shibae* DFL-12^T enthalten die Information für Proteine die ein Signalpeptid tragen. Viele dieser mehr als 1.000 annotierten Gene kodieren für bisher noch

nicht charakterisierte, hypothetische Proteine. Diese hohe Anzahl an sekretierbaren Proteinen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sich darunter auch hydrolytische Proteine befinden, welche *D. shibae* zum Abbau der von den Algen freigesetzten makromolekularen Substrate verwenden kann. So wurden z.B. in der Annotation von *D. shibae* DFL-12^T Gene identifiziert, die für eine Chitin-Decarboxylase und eine Polysaccharid-Lyase kodieren. Die experimentelle Bestätigung dieser annotierten Gene, sowie die Identifizierung zusätzlicher, für degradierende Proteine kodierende Gene, steht noch aus.

Gene, die für Proteine des Sec- und des Tat-Apparates kodieren, wurden für *D. shibae* DFL-12^T annotiert. Nicht eindeutig war die Annotation für Gene, welche entweder für Proteine des Typ II-Sekretionssystems kodieren könnten oder aber für solche des sehr ähnlichen Typ IV-Sekretionsapparates. Das Genom von *D. shibae* DFL-12^T trägt außerdem eine Vielzahl von für *Tripartite ATP-independent periplasmic transporter* (TRAP-Transporter) und für ATP-Bindekassette Transporter (ABC-Transporter) kodierende Gene. Dieses breite Spektrum an Transportern, die den Transport vieler verschiedener Substanzen in die Zelle ermöglichen, sowie eine große Auswahl an Stoffwechselwegen zur Verwertung dieser Substanzen, bieten *D. shibae* einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen sich im Biofilm befindlichen Arten.

1.2.2 Anaerober Energiemetabolismus

Im Biofilm auf Algen lebend ist *D. shibae* häufig anoxischen Lebensbedingungen ausgesetzt. So nimmt der Sauerstoffgehalt in tieferen Schichten eines Biofilms deutlich ab (de Beer *et al.*, 1994). Auch konnte gezeigt werden, dass in photosynthetischen Biofilmen in der Nacht anoxische Bedingungen herrschen können, welche durch verstärkte Atmung verursacht werden (Steunou *et al.*, 2008). Bisher wurde *D. shibae* als strikt aerobes Bakterium beschrieben (Biebl *et al.*, 2005). In der Genomannotation von *D. shibae* DFL-12^T wurden allerdings Gene identifiziert, die für Proteine kodieren, welche ein Wachstum unter anaeroben Bedingungen ermöglichen. So scheint es, dass *D. shibae* unter anaeroben Bedingungen die terminalen Elektronenakzeptoren Nitrat, Nitrit oder DMSO zur anaeroben Respiration nutzen kann. In Abwesenheit dieser Verbindungen könnten die Arginin- oder die Pyruvatfermentation dazu dienen, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen oder zumindest ein Langzeitüberleben zu gewährleisten (Wagner-Döbler *et al.*,

2010). Eine experimentelle Bestätigung dieser annotierten Gene auf kodierte metabolische Fähigkeit erfolgte bislang noch nicht. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten anaeroben Energiestoffwechsel Denitrifikation und Arginin-Fermentation kurz erläutert.

1.2.2.1 Denitrifikation

Die Denitrifikation umfasst einen mehrstufigen Prozess, in welchem Nitrat über die Zwischenprodukte Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffoxid zu elementarem Stickstoff reduziert wird. Sie stellt die effektivste Art der anaeroben Energiegenerierung dar. Der initiale Schritt der Denitrifikation, die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, wird von respiratorischen, dissimilatorischen Nitratreduktasen katalysiert. Für Bakterien wurden bisher drei verschiedene Arten von Nitratreduktasen beschrieben: eine cytoplasmatische assimilatorische Nitratreduktase Nas, eine membrangebundene respiratorische Nitratreduktase Nar sowie eine periplasmatische dissimilatorische Nitratreduktase Nap. Nur die beiden letztgenannten Reduktasen sind an der Denitrifikation beteiligt (Tabata, 2005). Das Genom von *D. shibae* DFL-12^T trägt lediglich Gene, welche für eine periplasmatische Nitratreduktase (*napFDAGHBC*) kodieren (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Dieses *nap*-System ist in Gram-negativen Bakterien weit verbreitet (Tabata, 2005). Die Nitratreduktase Nap besteht aus drei Untereinheiten: der großen katalytischen Untereinheit NapA, der kleinen Untereinheit NapB (ein im Periplasma lokalisiertes Di-Häm Cytochrom *c*), sowie NapC, ein membrangebundenes Tetra-Häm Cytochrom, welches Elektronen vom Quinonpool zum NapAB-Komplex transportiert (Philippot und Hojberg, 1999; Zumft, 1997; Tabata, 2005).

Die funktionelle Rolle der Nitratreduktase sowie die Regulation deren Genexpression divergieren zwischen einzelnen Arten erheblich. So initiiert die Nap z.B. in *Paracoccus pantotrophus* die Initiation der aeroben Denitrifikation (Bell *et al.*, 1990). Unter anaeroben Bedingungen wird die Expression der *nap*-Gene reprimiert (Sears *et al.*, 2000). Die Arten *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* können die *nap*-Gene in Anwesenheit von Nitrat sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen exprimieren. Es wurde postuliert, dass die Nap sowohl während der anaeroben Photosynthese als auch während der Aerobiose gewährleistet, dass das Redox-Gleichgewicht in den Zellen ausbalanciert bleibt (Richardson, 2000; Gavira *et al.*, 2002). *Escherichia coli* besitzt neben Genen, die für die Nap kodieren, auch zwei für Nar

Isoenzyme kodierende Gencluster. Die *nap*-Genexpression wird unter Anaerobiose induziert, wenn nur geringe Konzentrationen Nitrat vorliegen. Dies verschafft dem Bakterium einen Selektionsvorteil unter anaeroben Nitrat-limitierten Bedingungen (Potter *et al.*, 1999). Für *Pseudomonas sp.* G-179 und *R. sphaeroides f. sp. denitrificans* wurde beschrieben, dass die Nap als einzige Nitratreduktase das anaerobe Wachstum mit Nitrat ermöglicht (Bedzyk *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 1976).

Die weitere Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid wird durch die periplasmatische Nitritreduktase NirS, ein Cytochrom *cd₁*, katalysiert. Dieses Enzym ist Cytoplasmamembran-assoziiert. Die für das Enzym kodierenden Gene sind im *nirSECFDGHJN*-Gencluster organisiert. Die sich anschließende Reduktion des toxischen Zwischenproduktes Stickstoffmonoxid zu Distickstoffmonoxid erfolgt durch die Stickstoffmonoxid-Reduktase NorCB. Dieses Enzym ist in die Cytoplasmamembran integriert und wird durch das *norCBQDEF*-Cluster kodiert. Die finale Reduktion von Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff wird durch das periplasmatische, Cytoplasmamembran-assoziierte Enzym Distickstoffmonoxid-Reduktase (NosZ) katalysiert, welches durch das *nosRZDFYLX*-Cluster kodiert wird. In Abbildung 2 ist der schematische Ablauf der Denitrifikation in *D. shibae* dargestellt.

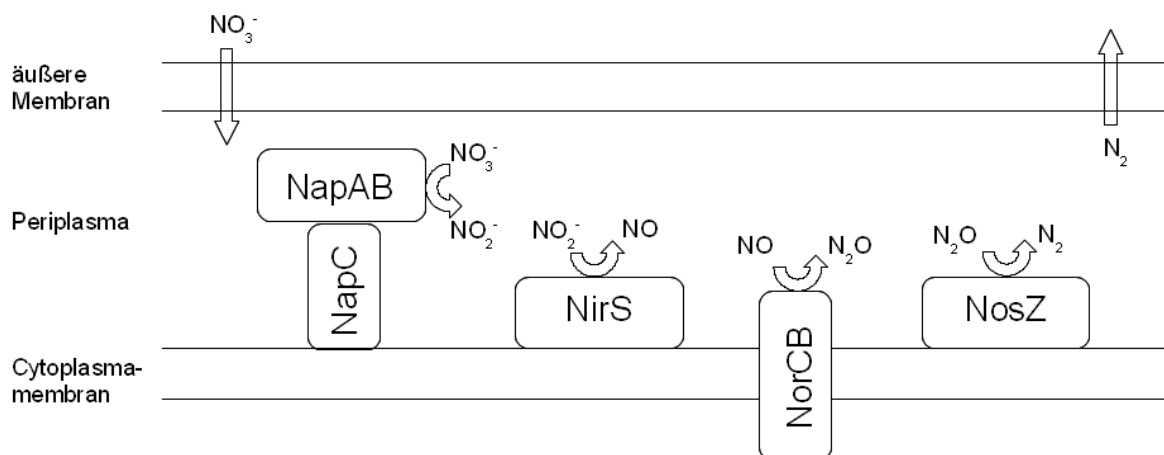


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Denitrifikation in *D. shibae*. Nitrat wird im Periplasma durch NapAB zu Nitrit reduziert. Im Anschluss erfolgt die Reduktion zu Stickstoffmonoxid durch das Enzym NirS sowie die weitere Reduktion zu Distickstoffmonoxid durch NorCB. Den letzten Schritt der Denitrifikation bildet die Reduktion des Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff durch das Enzym NosZ. Der gebildete Stickstoff wird im Anschluss von der Zelle freigesetzt. NapA = periplasmatische Nitratreduktase; NirS = Nitritreduktase; NorCB = Stickstoffmonoxid-Reduktase; NosZ = Distickstoffmonoxid-Reduktase.

Alle Gene, die für die Enzyme der Denitrifikation kodieren, sind in dem Genom von *D. shibae* DFL-12^T in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander lokalisiert. Zusätzlich finden sich dort auch Gene, welche für mögliche Regulatoren des anaeroben Stoffwechsels kodieren.

1.2.2.2 Arginin-Fermentation

D. shibae ist die bislang einzige Genom-sequenzierte Art des *Roseobacter*-Clusters, welche die für den Arginin-Deaminase Stoffwechselweg kodierenden Gene besitzt (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). In Abwesenheit eines terminalen Elektronenakzeptors wird hierbei unter Anaerobiose die Aminosäure Arginin zur Energiegewinnung verwendet. Der Abbau von Arginin erfolgt über drei Enzyme. Im ersten Schritt wird Arginin durch die Arginin-Deaminase (ArcA) zu Citrullin umgesetzt. Danach folgt der Abbau von Citrullin zu Ornithin und Carbamoylphosphat, katalysiert durch die Ornithin-Carbamoyltransferase ArcB. Carbamoylphosphat wird durch die Carbamat-Kinase ArcC weiter zu Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut. Hierbei entsteht durch Substratkettenphosphorylierung ein Molekül ATP. Das während des Abbaus entstandene Ornithin kann von der Zelle nicht weiter abgebaut werden. Es wird durch den in der Cytoplasmamembran lokalisierten Arginin-Ornithin-Antiporter ArcD aus der Zelle transportiert. Da für jedes umgesetzte Mol Arginin nur ein Mol ATP regeneriert werden kann, ist die Arginin-Fermentation keine sehr effektive Form des anaeroben Energiemetabolismus. So konnte z.B. für *P. aeruginosa* ein verdeutlicht langsames Wachstum während der Arginin-Fermentation festgestellt werden (Vander Wauven *et al.*, 1984). Da Arginin hierbei lediglich für die Regenerierung von ATP genutzt wird, ist außerdem eine alternative Kohlenstoffquelle erforderlich (Vander Wauven *et al.*, 1984).

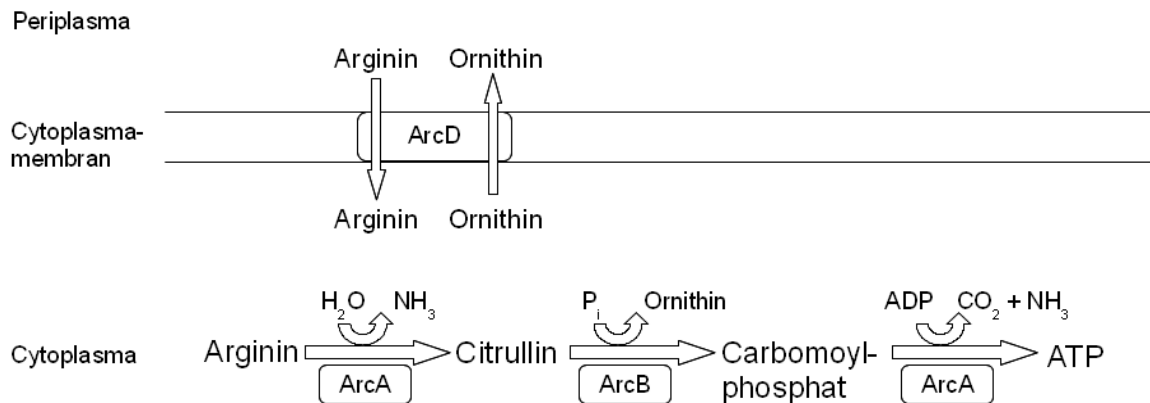


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Arginin-Fermentation in *D. shibae*. Arginin wird über den Arginin-Ornithin Antiporter ArcD in das Cytoplasma transportiert. Dort erfolgt die Umwandlung von Arginin durch die Enzyme ArcA, ArcB und ArcC. Als Fermentationsprodukte entstehen hierbei NH₃, CO₂ und Ornithin. Durch die Fermentation von Arginin wird ATP in äquimolaren Mengen regeneriert. ArcA = Arginin-Deaminase; ArcB = Ornithin-Carbamoyltransferase; ArcC = Carbamat-Kinase; ArcD = Arginin-Ornithin-Antiporter.

1.2.2.3 Die Regulation des anaeroben Stoffwechsels

Um auf wechselnde Umweltbedingungen effektiv reagieren zu können, wird eine fein abgestimmte Regulation der Genexpression benötigt. Die Regulation einiger Denitrifikationsgene erfolgt über Regulatoren der Crp-Fnr-Familie. So reguliert der globale Regulator der Fumarat- und Nitratreduktion (Fnr) in *E. coli* unter anderem die Expression der für die Nitrat- und Nitritreduktase kodierenden Gene (Korner *et al.*, 2003). Fnr liegt unter anaeroben Bedingungen als aktives Homodimer vor, wobei jedes der Monomere ein [4Fe-4S]²⁺-Zentrum zur Detektion von Sauerstoff enthält (Lazazzera *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997). Unter aeroben Bedingungen zerfallen die [4Fe-4S]²⁺-Zentren zu [2Fe-2S]²⁺-Zentren und das aktive Fnr-Dimer liegt in seinen inaktiven Monomeren vor (Khoroshilova *et al.*, 1997; Popescu *et al.*, 1998). Die Expression der Gene der zur Crp-Fnr-Familie gehörenden Nitratespirations-Regulatoren (Dnr) wird von Fnr-Typ Proteinen reguliert. Dnr-Regulatoren sind ebenfalls in die Denitrifikation involviert und nutzen wahrscheinlich Stickstoffmonoxid als Signal (Arai *et al.*, 1997; Rinaldo *et al.*, 2005).

In dem Genom von *D. shibae* wurden sechs Gene, die für Regulatoren der Crp-Fnr-Familie kodieren könnten, annotiert. Eines der Genprodukte trägt vier Cysteinreste, welche für die Ausbildung eines Eisen-Schwefelzentrums, wie es in Fnr vorkommt, benötigt werden.

Zwei weitere ähneln Dnr-Regulatoren (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Die experimentelle Bestätigung der Funktion der Genprodukte sowie ihre Rolle in der Regulation der Anaerobiose in *D. shibae* stehen bislang noch aus. Die Regulation des anaeroben Stoffwechsels wird im Folgenden anhand der Denitrifikation und Arginin-Fermentation in *P. aeruginosa* erklärt.

In *P. aeruginosa* induziert der Regulator Anr, welcher ein Homolog zu Fnr aus *E. coli* darstellt, unter Sauerstoffmangel die Expression der für die cytoplasmatische Nitratreduktase kodierenden Gene des *nar*-Operons sowie die für die Enzyme der Arginin-Fermentation kodierenden Gene des *arcDABC*-Operons. Zusätzlich wird die Expression des eigenen Genes *anr*, die für das Zwei-Komponentensystem NarX-NarL kodierenden Gene *narXL* und das für den Regulator Dnr kodierende Gen *dnr* induziert. Das Zwei-Komponentensystem NarX-NarL besteht aus der Sensorkinase NarX, ein Nitrat-detektierendes Protein sowie dem Antwortregulator NarL. Durch das Signal Nitrat induziert NarX-NarL ebenfalls die Expression des *nar*-Operons sowie des Genes *dnr*. Gleichzeitig wird die Expression des *arcDABC*-Operons durch NarX-NarL reprimiert. Detektiert der Regulator Dnr Stickstoffmonoxid in der Zelle, induziert er die Expression des *nar*-Operons sowie des *nir*-, *nor*- und *nos*-Operons, welche für die Nitritreduktase (NirS), die Stickstoffmonoxid-Reduktase (NorCB) und die Distickstoffmonoxid-Reduktase (NosZ) kodieren. Außerdem wird die Expression von *nirQ* induziert. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das für die posttranslationale Aktivierung von NirS essentiell ist. Es wurde postuliert, dass die Detektion von Stickstoffmonoxid durch Dnr über Häm als prosthetische Gruppe erfolgt. In Abwesenheit von Nitrat liegen weder NarX-NarL noch Dnr aktiv vor. Demnach erfolgt unter diesen Bedingungen auch keine Repression des *arcDABC*-Operons durch NarX-NarL. Stattdessen wird die Expression des *arcDABC*-Operons durch Anr induziert. Eine zusätzliche Induktion der Expression erfolgt in Anwesenheit von Arginin durch den Arginin-detektierenden Regulator ArgR (Schobert und Tielen, 2010). In Abbildung 4 ist die Regulation des anaeroben Stoffwechsels in *P. aeruginosa* schematisch dargestellt.

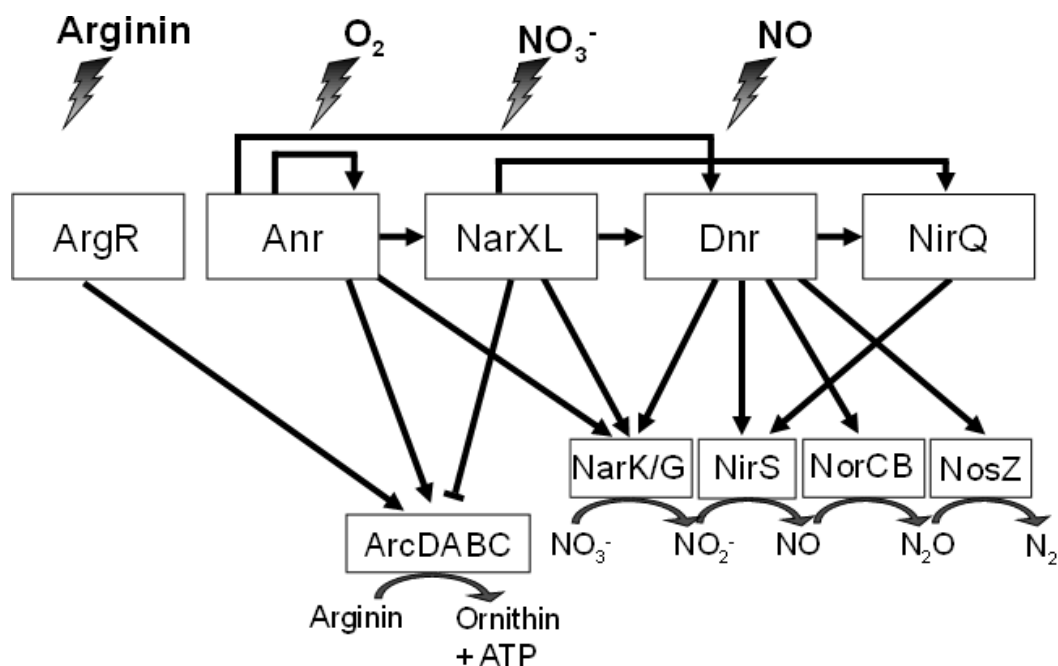


Abbildung 4: Regulation des anaeroben Metabolismus in *P. aeruginosa* modifiziert nach Schobert und Tielen (2010). Zum besseren Verständnis ist lediglich die Regulation der Denitrifikation und Arginin-Fermentation dargestellt.

Neben Genen, die für die potentiellen Regulatoren Fnr und Dnr kodieren, konnten außerdem 31 Gene im Genom von *D. shibae* DFL-12^T identifiziert werden, deren Promotoren eine Fnr-Bindesequenz tragen (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Dazu gehören neben einem Gen, das für einen putativen anaeroben Regulator Dnr und einem Gen, das für eine Untereinheit eines Nitrat-Transporters kodiert, auch Gene der Porphyrin- und Chlorophyll-Biosynthese. Dies ist ein Hinweis darauf, dass neben dem Faktor Sauerstoff auch der Faktor Licht in den anaeroben Stoffwechsel von *D. shibae* involviert sein könnte.

1.2.3 Aerob anoxygene Photosynthese

Die ersten aeroben, Bacteriochlorophyll *a* enthaltenden Stämme der *Roseobacter*-Gruppe wurden 1979 von Shiba beschrieben. Spätere Studien zeigten, dass diese Bakterienstämme viele Habitate der Weltmeere besiedeln (Yurkov und Beatty, 1998; Kolber *et al.*, 2000). Ihre ökologische Relevanz wurde deutlich, als bei *in situ* Chlorophyll-Messungen ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Bacteriochlorophyll *a* detektiert wurden. Es wurde postuliert, dass dieses Bacteriochlorophyll *a* mit etwa 10 % zu der Primärproduktion der

oberen Wasserschichten beitragen könnte (Kolber *et al.*, 2001). Andere Studien sprechen ihr eine eher untergeordnete Rolle innerhalb des globalen Kohlenstoff-Kreislaufes zu (Schwalbach, 2005). Aerob phototrophe Bakterien sind innerhalb der α 3-Untergruppe der *Proteobakterien* weit verbreitet, was die Vermutung nahe legt, dass sie sich aus verschiedenen unabhängigen Linien der nahe verwandten photosynthetischen Purpurbakterien entwickelt haben und eine evolutionäre Zwischenstufe von anaeroben Purpurbakterien zu nicht-photosynthetischen Aerobiern darstellen. Heterogenitäten bezüglich der 16S rRNA sowie unterschiedlich aufgebaute Photosynthese-Apparate stützen diese These (Woese *et al.*, 1984; Yurkov und Beatty, 1998; Kolber *et al.*, 2000).

Der Aufbau des photosynthetischen Apparates, des Elektronentransfers sowie der Aminosäuresequenzen von Proteinen des Lichtsammelkomplexes I und des Reaktionszentrums unterscheiden sich zwischen aerob phototrophen Bakterienarten und photosynthetischen Purpurbakterien nicht (Yurkov und Beatty, 1998).

Den wesentliche Unterschied von aerob phototrophen Bakterien zu photosynthetischen Purpurbakterien stellt die Regulation der Photosynthese dar. Letztere betreiben anaerobe anoxygene Photosynthese (AnAnP), was bedeutet, dass sie unter anaeroben Bedingungen die anoxygene Photosynthese dazu nutzen können um Energie zu generieren (photoautotrophes Wachstum). In Anwesenheit von Sauerstoff findet ausschließlich heterotrophes Wachstum statt. Der Aufbau ihres Photosynthese-Apparates erfolgt nur unter anaeroben Bedingungen. Hierbei wirken hohe Lichtintensitäten reprimierend auf die Bacteriochlorophyll *a*-Synthese, wohingegen bei geringen Lichtintensitäten die Produktion maximiert wird (Yurkov und Beatty, 1998). Bisher wurden erst zwei Arten beschrieben (*Rhodopseudomonas sulfidophila* und *Rhodospirillum centenum*), die befähigt sind, sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ihren Photosynthese-Apparat auszubilden (Hansen und Veldkamp 1973; Nickens *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu den photosynthetischen Purpurbakterien findet die anoxygene Photosynthese bei den aerob phototrophen Bakterien ausschließlich unter aeroben Bedingungen statt (aerob anoxygene Photosynthese, AAnP). Sie sind nicht zu einer photoautotrophen Lebensweise befähigt. Unter aeroben Bedingungen wird die AAnP lediglich als zusätzliche Energiequelle genutzt, wobei jedoch kein Kohlenstoff fixiert wird. Diese zusätzliche Nutzung der Lichtenergie neben der Verwertung vieler verschiedener

organischer Kohlenstoffquellen könnte den AAnP betreibenden Bakterien in Habitaten mit limitiertem Kohlenstoffvorkommen einen Wachstumsvorteil bieten (Kolber *et al.*, 2001; Buchan *et al.*, 2005).

Die Ausbildung des Photosynthese-Apparates bei aerob phototrophen Bakterien erfolgt ausschließlich unter aeroben Bedingungen in Abwesenheit von Licht. Schon geringste Lichtintensitäten ($20 \mu\text{mol Photonen/m}^2\cdot\text{s}$) wirken inhibierend auf die Synthese von Bacteriochlorophyll *a* (Yurkov, 1993).

Zu der Gruppe der aerob phototrophen Bakterien gehören auch Mitglieder des *Roseobacter*-Clusters (Beja *et al.*, 2002). Bei den ersten beiden beschriebenen Vertretern dieser Gruppe, *R. denitrificans* und *R. litoralis*, wurde die Fähigkeit zur AAnP 1991 von Shiba beobachtet. Weiter Arten des *Roseobacter*-Clusters, wie z.B. *Hoflea phototrophicum* und *Staleyia guttiformis*, besitzen Gene, die vermuten lassen, dass diese Arten ebenfalls befähigt sind, AAnP zu betreiben (Allgaier *et al.*, 2003). Die Annotation des Modellorganismus *D. shibae* DFL-12^T zeigte, dass dieser Stamm ebenfalls die für die AAnP nötigen Gene besitzt (Wagner-Döbler *et al.*, 2010).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass für eine bedeutende Gruppe mariner Bakterien inzwischen eine Reihe an Genomen vorliegen, aber wesentliche Fragen zum Energiestoffwechsel, seiner Koordination mit der Photosynthese und der zugrunde liegenden Regulatoren völlig offen sind.

2 Zielsetzung der Arbeit

Der *Roseobacter*-Cluster ist eine bedeutende Gruppe mariner Bakterien über deren metabolische Fähigkeiten zur Nährstofferschließung und Energiegewinnung wenig bekannt ist. Am Modellbakterium *Dinoroseobacter shibae* sollte deshalb beispielhaft die Sekretion von Exoenzymen zum Polymerabbau und der Energiestoffwechsel mit seiner genetischen Regulation untersucht werden. Dazu waren folgende Schritte nötig:

1. Etablierung eines genetischen Systems zur Transformation als Basis für eine Reportergentechnologie und Geninaktivierung.
2. Physiologische Charakterisierung der anaeroben Formen der Energiegewinnung.
3. Definition anaerober Regulons mittels DNA-Array Technologie mit Schwerpunkt auf neuartigen Regulatoren.
4. Untersuchung des Einflusses von Licht auf anaerobe Physiologie und Genregulation.
5. Methodenentwicklung für eine Sekretomanalyse mittels Proteomtechnologie.
6. Untersuchung des Einflusses der Symbiose von *D. shibae* mit dem Dinoflagellaten *Isochrysis galbana* auf das bakterielle Sekretom.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Modell / Bezeichnung	Referenz
Agarosegelelektrophorese-Apparatur	Agagel Mini, Agagel Standard, Powersupply	Biometra, Göttingen, Deutschland
Agarosegeldokumentationsanlage	GelDoc, Quantity One	BioRad, München, Deutschland
Autoklav	Autoklav vom Typ FVA/A1	Fedegari, Bedano, Schweiz
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II, Pulse Controller Plus	BioRad, München, Deutschland
Lagerung/Kühlung	Liebherr Comfort, Liebherr Premium VIP Series -86 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland Sanyo, München, Deutschland
Lumineszenz-Spektrometer	LS50B	Perkin Elmer, Waltham, USA
Microarray-Scanner	High-Resolution Microarray Scanner	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Microarray-Hybridisierungskammer	DNA Microarray Hybridization Chamber SureHyb	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Microarray-Hybridisierungsofen	DNA Microarray Hybridization Oven	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
pH-Messgerät	pH211 Mikroprozessor pH-Meter	HANNA Instruments, Woonsocket, USA
Photometer	Ultrospec2100pro	GE Healthcare Europe, München, Deutschland
	Nanodrop	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Photonenstromdichtemessgerät	Li-250	LI-CORr Inc., Lincoln, USA
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore, Billerica, USA
Rollentaumelmischgerät	RM5	Ingenieurbüro CAT, Staufen, Deutschland
Scanner	Canon Scan LIDE 20	Canon, Tokio, Japan

Material und Methoden

Gerät	Modell / Bezeichnung	Referenz
Schüttler	TR 150	Infors, Bottmingen, Schweiz
SDS-PAGE-Apparatur	Mini Protean II	BioRad, München, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waagen	ACL-3100.2, BL1500, BL61S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
	Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	RC 5B Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	Avanti J-30I Centrifuge	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
	Optima L-90K Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Fullerton, USA

3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Kits von folgenden Firmen bezogen: Acila (Weiterstadt, Deutschland), Agilent Technologies (Santa Clara, USA), Bio-Rad (München, Deutschland), Difco Laboratories Inc (Detroit, USA), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Finnzymes (Espoo, Finnland), Fluka (Buchs, Schweiz), GE Healthcare Europe (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Millipore (Billerica, USA), New England Biolabs (Ipswich, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland), Riedel-de-Häen (München, Deutschland), Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.3 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-12 ^T	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Prorocentrum lima</i> , Typstamm, DSM16493 ^T	(Biebl <i>et al.</i> , 2005)
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-16	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	(Allgaier <i>et al.</i> , 2003)
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-27	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	(Biebl <i>et al.</i> , 2005; Allgaier <i>et al.</i> , 2003)
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-30	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	(Allgaier <i>et al.</i> , 2003)
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-31	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	(Allgaier <i>et al.</i> , 2003)
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-36	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	(Allgaier <i>et al.</i> , 2003)
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL-38	isoliert von dem Dinoflagellaten <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	(Allgaier <i>et al.</i> , 2003)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>endA1 hsdR1</i> [rK ⁻ mK ⁺] <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA relA</i> Δ [<i>lacZYA-argF</i>]U169 <i>deoR</i> [Φ 80 <i>dlac</i> Δ [<i>lacZ</i>]M15)	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F ⁻ <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> Δ <i>lacX74</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) λ ⁻	(Casadaban und Cohen, 1980)
<i>Escherichia coli</i> ST18	S17-1 Δ <i>hemA thi pro hsdR-M</i> - mit chromosomal integriertem [RP4-2 Tc::Mu:Km ^r ::Tn7, Tra ⁺ Tri ^r Str ^r]	(Thoma und Schobert, 2009)
<i>Oceanibulbus indolifex</i> HEL-45 ^T	isoliert aus einer Meerwasserprobe, Typstamm, DSM14862 ^T	(Wagner-Döbler <i>et al.</i> , 2004)
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> 2.10	Wildtyp	(Ruiz-Ponte <i>et al.</i> , 1998; Martens <i>et al.</i> , 2006)
<i>Phaeobacter inhibens</i> T5 ^T	Typstamm, DSM16374 ^T	(Martens <i>et al.</i> , 2006)
<i>Roseobacter denitrificans</i> 7001 ^T	Typstamm, DSM7001 ^T	(Shiba, 1991)
<i>Roseobacter litoralis</i> 6996 ^T	Typstamm, DSM6996 ^T	(Shiba, 1991)

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Name	Beschreibung	Referenz
pBBR1MCS1	4,72 kb Cm ^r <i>lacZ</i> P _{lac} P _{T7} <i>rep</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1994)
pBBR1MCS2	5,14 kb Km ^r <i>lacZ</i> P _{lac} P _{T7} <i>rep</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS3	5,23 kb Tet ^r <i>lacZ</i> P _{lac} P _{T7} <i>rep</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS4	4,95 kb Amp ^r <i>lacZ</i> P _{lac} P _{T7} <i>rep</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS5	4,77 kb Gm ^r <i>lacZ</i> P _{lac} P _{T7} <i>rep</i>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pFLP2	9,4 kb IncP Amp ^r Flp recombinase <i>ori1600 oriT</i>	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pLAFR3	22,0 kb IncP Tet ^r RP4	(Staskawicz <i>et al.</i> , 1987)
pMMB67EH	8,8 kb IncQ Amp ^r <i>lacI^q</i> P _{lac} <i>rrnB oriV oriT</i>	(Furste <i>et al.</i> , 1986)
pPS858	4,5 kb Amp ^r , Gm ^r , GFP ⁺	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pRhokHi-2-FbFP	7,38 kb Cm ^r Km ^r P _{T7} <i>FbFP</i> unter Kontrolle von P _{aphII} konstruiert aus pBBR1MCS1	(Drepper <i>et al.</i> , 2007; Katzke <i>et al.</i> , 2010)
pRSF1010	8,7 kb IncQ Sm ^r Su ^r <i>repA repB repC</i>	(Scholz, 1989)
pUCP20T	4,17 kb IncP Amp ^r P _{lac} <i>ori1600 oriT</i>	(Schweizer, 1996)

3.4 Medien und Medienzusätze

3.4.1 Medien für das Wachstum von *Escherichia coli* und Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Als Standardmedium für die Kultivierung von *E. coli* wurde, wenn nicht anders angegeben, Luria Bertani (LB)-Medium verwendet (Sambrook und Russell, 2001). Für die Kultivierung auf festem Medium wurden der Lösung 1,5 % (w/v) Agar-Agar vor der Sterilisation zugegeben. Die Kultivierung des Stammes *E. coli* ST18 erforderte außerdem einen Zusatz von 50 µg/ml Aminolävulinsäure (ALA; Fluka, Buchs, Schweiz) nach erfolgter Sterilisation.

LB-Medium	5,0	g/l	Hefeextrakt
	10,0	g/l	Pepton
	5,0	g/l	NaCl
	in deion. H ₂ O		

Für die Kultivierung in LB-Medium mit erhöhten Ionen-Konzentrationen, wurde das LB-Medium vor der Sterilisation mit einem Zusatz von 0,85 % (w/v) Meersalz (LB+hs) bzw. 1,7 % (w/v) Meersalz (LB+s) versehen. Für die Kultivierung auf festem Medium wurden der Lösung 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Vor der eigentlichen Sterilisation wurde

Agar-haltiges Medium kurz bis zum Sieden erhitzt, um ein Ausfällen von Medienbestandteilen aufgrund hoher Salzkonzentrationen zu vermeiden.

Die Kultivierung von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Marine Bouillon (MB)-Medium oder Salzwassermedium (SW). Wurde auf eine Antibiotika-Resistenz selektiert, wurde halbkonzentriertes MB-Medium (hMB) verwendet, um die Degradation der verwendeten Antibiotika durch zu hohe Salzkonzentrationen zu vermeiden. Für die Kultivierung auf festem Medium wurden der jeweiligen Lösung 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Agar-haltiges Medium wurde vor der eigentlichen Sterilisation kurz bis zum Sieden erhitzt, um ein Ausfällen von Medienbestandteilen aufgrund hoher Salzkonzentrationen zu vermeiden.

MB-Medium	40,0 g/l	Marine Bouillon (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
		in deion. H ₂ O

hMB-Medium	20,0 g/l	Marine Bouillon (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
		in deion. H ₂ O

SW-Medium pH 7,0	4,0 g/l	Na ₂ SO ₄
	250,0 mg/l	NH ₄ Cl
	20,0 g/l	NaCl
	3,0 g/l	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
	500,0 mg/l	KCl
	10,0 ml/l	CaCl ₂ · 6 H ₂ O Lösung (100x)
	10,0 ml/l	KH ₂ PO ₄ Lösung (100x)
	2,0 g/l	Succinat
		in deion. H ₂ O
		Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 7,0

*nach Sterilisation
Zugabe von:*

100,0 ml/l	NaHCO ₃ Lösung (10 x)
10,0 ml/l	Vitaminlösung (100 x)
2,0 ml/l	Spurenelemente-Lösung (500 x)

100 x CaCl ₂ · 6 H ₂ O	1,50 g/l	CaCl ₂ · 6 H ₂ O
		in deion. H ₂ O

Material und Methoden

100 x KH_2PO_4	2,0 g/l KH_2PO_4 in deion. H_2O
10 x NaHCO_3	1,9 g/l NaHCO_3 in deion. H_2O
100 x Vitaminlösung	200,0 mg/l Biotin 2,0 g/l Nikotinsäure 800,0 mg/l 4-Aminobenzoessäure in deion. H_2O , anschließend steril filtriert
500 x Spurenelemente	1,05 g $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 6,5 ml HCl , 25 %ig 2,6 g Titriplex III (Na_2EDTA) etwas deion. H_2O Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 6,0 bis 6,5
<i>nach Einstellen des pH-Wertes</i>	
<i>Zugabe von:</i>	
	15,0 mg H_3BO_3
	50,0 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
	95,0 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
	12,0 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
	1,0 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	72,0 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	18,0 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	mit deion. H_2O auf 500 ml auffüllen

3.4.2 Antibiotika und Medienzusätze

Antibiotika und Medienzusätze wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert (Tab. 4). Diese Stammlösungen wurden den sterilisierten, auf 50 °C abgekühlten Medien in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika und Medienzusätze.

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration Medium [μ g/ml]
Ampicillin	deion. H ₂ O	100 und 500	10 - 500
Carbenicillin	deion. H ₂ O	100 und 500	2 - 500
Chloramphenicol	Ethanol 100 %	100	5 - 100
Gentamycin	deion. H ₂ O	100	150
Kanamycin	deion. H ₂ O	100 und 500	10 - 500
Spectinomycin	deion. H ₂ O	20 und 100	2 - 150
Streptomycin	deion. H ₂ O	20 und 100	2 - 200
Tetracyclin	Ethanol 70 %	100	5 - 100
Aminolävulinsäure	deion. H ₂ O	50	50

3.5 Mikrobiologische Techniken

3.5.1 Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer bei 121 °C für 20 min und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Puffer für RNA-Arbeiten wurden doppelt dampfsterilisiert. Antibiotika und andere temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser des Celluloseacetatfilters 0,2 μ m).

3.5.2 Lagerung von Bakterienkulturen

Die Stämme wurden auf Agarplatten bei 4 °C bis zu 4 Wochen gelagert. Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden Glycerin-Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden *E. coli* Kulturen für 16 Stunden bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Bakterienkulturen der *Roseobacter*-Gruppe wurden zwischen 16 und 30 Stunden bei 200 rpm und 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit sterilem Glycerin (Endkonzentration 20 % (v/v)) vermischt und bei -80 °C gelagert.

3.5.3 Bakterienkultivierung auf Agarplatten

3.5.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Glycerin-Gefrierkultur (20 % (v/v) Glycerin) Bakterien entnommen und auf eine LB-Agar-Platte, welche bei Bedarf mit den entsprechenden Antibiotika versetzt war, ausgestrichen. Für die Kultivierung von *E. coli* ST18 wurde der LB-Agar nach Sterilisation zusätzlich mit 50 µg/ml ALA versetzt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden auf einer LB-Agar-Platte vereinzelt und die Platte wie oben angegeben inkubiert.

3.5.3.2 Kultivierung von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Glycerin-Gefrierkultur (20 % (v/v) Glycerin) Bakterien entnommen und auf eine MB-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde zwei Tage bei 30 °C und im Anschluss bis zu sieben Tagen bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Austrocknen des Agars zu vermeiden. Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden auf einer MB-Agar-Platte vereinzelt und die Platte wie oben angegeben inkubiert. Wurde auf eine Antibiotika-Resistenz selektiert, erfolgte die Kultivierung mit hMB, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war. So wurde eine Inaktivierung der Antibiotika durch zu hohe Salzkonzentrationen vermieden.

3.5.4 Flüssigkulturen von *Escherichia coli* und Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

3.5.4.1 Wachstumsbedingungen für *Escherichia coli*

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glycerin-Gefrierkultur (20 % (v/v) Glycerin) Bakterien entnommen und in ein Reagenzröhrchen mit 5 ml Flüssigmedium überführt, welches bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika enthielt. Für die Kultivierung von *E. coli* ST18 wurde das Medium nach Sterilisation zusätzlich mit 50 µg/ml ALA versetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Anschließend wurde ausgehend von dieser Kultur eine Hauptkultur von 100 ml Flüssigmedium in einem 300 ml Schikanekolben mit einer Start-OD_{578nm} von 0,05 inokuliert und ebenfalls bei 37 °C und 200 rpm bis zur gewünschten optischen Dichte inkubiert.

3.5.4.2 Wachstumsbedingungen für Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Mit einer sterilen Impföse wurden von einer MB-Agar-Platte oder aus einer Glycerin-Gefrierkultur (20 % (v/v) Glycerin) Bakterien entnommen und in ein Reagenzröhrchen mit 5 ml Flüssigmedium überführt. Wurde auf eine Antibiotika-Resistenz selektiert, erfolgte die Kultivierung in hMB-Medium mit einem Zusatz des entsprechenden Antibiotikums. Dadurch wurde die Inaktivierung der Antibiotika durch zu hohe Salzkonzentrationen vermieden. Die Kultur wurde bei 200 rpm und 30 °C für 24 - 36 h inkubiert. Ausgehend von dieser Kultur wurde eine Vorkultur inokuliert, deren optische Dichte zu Beginn der Kultivierung 0,05 betrug. Die Vorkultur wurde für etwa 24 - 36 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde mit dieser Vorkultur eine Hauptkultur inokuliert, deren Start-OD_{578nm} 0,05 betrug. Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte ebenfalls bei 30 °C, 200 rpm und je nach gewünschter Wachstumsphase der Bakterien über einen Zeitraum zwischen 18 und 40 h.

Anaerobe Kulturen wurden nach Inokulation mit einer Vorkultur in vollständig gefüllten 125 ml Transfusionsflaschen, die mit einem Silikonseptum und einer Schraubdichtung verschlossen waren, bei 100 rpm und 30 °C inkubiert. Die Start-OD_{578nm} der anaeroben Kulturen betrug ebenfalls 0,05.

3.5.5 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Für Zelldichten mit einer OD_{578nm} > 0,8 wurden vor der Messung dezimale Verdünnungen der Kultur mit dem jeweils verwendeten Medium hergestellt. Eine OD_{578nm} von 1 entsprach hierbei für *E. coli* etwa 1×10^9 Zellen/ml und für *D. shibae* ca. 1×10^{10} Zellen/ml.

3.5.6 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC)

Zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) wurde zu 5 ml hMB Medium frisch hergestellte Antibiotikallösung gegeben. Die Antibiotika-Konzentration betrug zwischen 0 und 500 µg/ml in 5 µg-Schritten. Das Medium wurde mit einer für 24 h bei 30 °C und 200 rpm kultivierten MB-Vorkultur des jeweiligen Bakterienstammes so inokuliert, dass die Start-OD_{578nm} 0,05 betrug. Die Kulturen wurden bei 30 °C stehend

inkubiert und das Wachstum nach 3 sowie 5 Tagen kontrolliert. Die MIC wurde hierbei definiert als die geringste Konzentration eines Antibiotikums, bei der eine Trübung des Mediums aufgrund Bakterienwachstums optisch nicht mehr feststellbar war. Ein Stamm wurde als resistent gegen ein Antibiotikum bezeichnet, wenn seine MIC für das entsprechende Antibiotikum $>100 \mu\text{g/ml}$ war. Alle MIC Bestimmungen wurden dreimalig als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.5.7 Test der Antibiotikastabilitäten

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität der in Kapitel 3.5.6 verwendeten Antibiotika wurden in Doppelbestimmung je 5 ml LB-, MB- und hMB-Medium mit $50 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ und $500 \mu\text{g/ml}$ der entsprechenden Antibiotika versetzt und 5 Tage bei 30°C gelagert. Vor und nach der Lagerung wurde jeweils ein steriles Filterplättchen mit dem Medium getränkt. Dieses Plättchen wurde mittig auf eine LB-Agarplatte gelegt, auf welcher zuvor $100 \mu\text{l}$ einer *E. coli* DH10B Kultur ($\text{OD}_{578\text{nm}} = 1,0$) ausgestrichen wurden. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am darauffolgenden Tag die Hemmhofbildung kontrolliert. Nach weiterer viertägiger Inkubation bei 37°C wurden die Agarplatten erneut auf Hemmhofbildung kontrolliert. Ein gleichbleibend großer Hemmhof nach ein- und fünftägiger Inkubation war hierbei ein Indikator für die Stabilität des betreffenden Antibiotikums bei 30°C .

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* ST18 Zellen

Für eine Übernachtskultur von *E. coli* ST18 wurden 5 ml LB-Medium mit einem Zusatz von $50 \mu\text{g/ml}$ ALA mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Ein ml dieser Kultur wurde im Anschluss dazu verwendet, 100 ml LB-Medium mit $50 \mu\text{g/ml}$ ALA zu inokulieren. Die Kultur wurde bei 37°C und 200 rpm bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (15 min, 3.345 g, 4°C). Das erhaltene Sediment wurde in 10 ml kalter Pufferlösung (10 % (v/v) Glycerin, 100 mM CaCl_2) suspendiert und erneut sedimentiert (15 min, 3.345 g, 4°C). Das Sediment wurde vorsichtig in 1 ml kaltem Puffer (10 % (v/v) Glycerin, 100 mM CaCl_2) suspendiert und anschließend für 0,5 - 2 Stunden auf Eis

inkubiert. Nach Aliquotieren der Zellen zu je 50 µl wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6.2 Transformation chemokompetenter *Escherichia coli* ST18 Zellen

Fünzig µl CaCl₂-kompetente *E. coli* ST18 Zellen wurden vorsichtig mit 50 ng Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis gelagert. Nach anschließender zweiminütiger Inkubation bei 42 °C wurde 1 ml LB-Medium mit 50 µg/ml ALA zu den Zellen gegeben und diese für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.3 Herstellung chemokompetenter Zellen von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

3.6.3.1 CaCl₂-kompetente Zellen von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Fünf ml MB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterienstammes inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht kultiviert. Zwei ml dieser Kultur wurden verwendet, um 100 ml MB-Medium zu inokulieren. Die Kultur wurde bei 30 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD_{578nm} von 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (15 min, 3.345 g, 4 °C). Das erhaltene Zellsediment wurde in 2 ml kalter Pufferlösung (10 % (v/v) Glycerin, 100 mM CaCl₂) suspendiert und erneut sedimentiert (2 min, 8.000 g, 4 °C). Das Sediment wurde vorsichtig in 1 ml kaltem Puffer (10 % (v/v) Glycerin, 100 mM CaCl₂) suspendiert und anschließend 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden entweder direkt verwendet oder nach Aufteilung in je 50 µl große Teilmengen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6.3.2 RbCl₂-kompetente Zellen von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Fünf ml MB-Medium mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ wurden mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterienstammes inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht kultiviert. Zwei ml dieser Kultur wurden verwendet, um 100 ml MB-Medium zu inokulieren. Die Kultur wurde bei 30 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD_{578nm} von 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (15 min, 3.345 g, 4 °C). Das erhaltene Zellsediment wurde in 2 ml kalter Pufferlösung (100 mM CaCl₂, 50 mM RbCl₂,

40 mM MnCl_2) suspendiert und erneut sedimentiert (2 min, 8.000 g, 4 °C). Das Sediment wurde vorsichtig in 1 ml kaltem Puffer (100 mM CaCl_2 , 50 mM RbCl_2 , 40 mM MnCl_2) suspendiert und anschließend 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden entweder direkt verwendet oder nach Zusatz von 20 % Glycerin (v/v) zu je 50 μl großen Mengen aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Transformation chemokompetenter Zellen von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Fünfundzig μl der mit CaCl_2 oder RbCl_2 behandelten chemokompetente Bakterienzellen wurden vorsichtig mit 50 ng Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis gelagert. Nach zweiminütiger Inkubation bei 42 °C wurde 1 ml MB-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 3 Stunden bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf hMB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert, bei 30 °C inkubiert und zur Ermittlung der Transformationseffizienz nach zwei Tagen die Koloniebildenden Einheiten (KbE) bestimmt. Um die Lagerfähigkeit der chemokompetenten Zellen zu bestimmen, wurden für die Transformation Zellen verwendet, die für verschieden lange Zeiträume bei -80 °C gelagert wurden.

3.6.5 Herstellung elektrokompetenter Zellen von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Fünf ml MB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterienstammes inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Zwei ml dieser Kultur wurden verwendet, um 100 ml MB-Medium zu inokulieren. Die Kultur wurde bei 30 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (15 min, 3.345 g, 4 °C). Das erhaltene Sediment wurde zwei- bis fünfmal mit 10 ml kalter 10%iger (v/v) Glycerinlösung gewaschen und erneut sedimentiert (2 min, 10.000 g, 4 °C). Das Sediment wurde vorsichtig in 1 ml 10%iger (v/v) Glycerinlösung suspendiert. Nach Aliquotieren der Zellen wurden diese entweder direkt verwendet oder zu je 50 μl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6.6 Transformation elektrokompenter Zellen von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Fünzig µl elektrokompente Bakterienzellen wurden vorsichtig mit 25 oder 50 ng Plasmid-DNA gemischt. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) gegeben. Die Einstellungen des Elektroporationsgerätes GenePulserII (BioRad, München, Deutschland) waren wie folgt:

Kapazität	25,0	µF
Spannung	1,5 – 3,0	kV
Widerstand	200	Ω
Spannungsstoß	4,8 – 5,0	ms

Nach erfolgtem Puls wurden die Zellen mit 1 ml MB-Medium versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur und 300 rpm inkubiert. Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurde eine Verdünnungsreihe mit 1,7%iger (w/v) Meersalz-Lösung erstellt und die jeweiligen Verdünnungen auf hMB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, sowie Antibiotika-freien hMB-Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KbE) für beide Bedingungen bestimmt. Die Transformationseffizienz wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{KbE_{(ohne\ Antibiotikum)}}{\mu g_{Plasmid-DNA}} - \frac{KbE_{(mit\ Antibiotikum)}}{\mu g_{Plasmid-DNA}}$$

3.6.7 Konjugaler Transfer von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* ST18 in Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe

Der jeweilige Rezipientenstamm der *Roseobacter*-Gruppe wurde in MB-Medium für 18 h bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Der Donorstamm *E. coli* ST18, der das jeweilige zu übertragende Plasmid trug, wurde in LB-Medium mit 50 µg/ml ALA bei 30 °C bis zu einer OD_{578nm} von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Beide Kulturen wurden anschließend so gemischt, dass, bezogen auf die optische Dichte, Verhältnisse von Donor zu Rezipient von 1:1, 2:1, 5:1 oder 10:1 eingestellt wurden. Die Zellen wurden sedimentiert (2 min, 8.000 g, 20 °C), der Überstand dekantiert und das Sediment in dem verbleibenden Flüssigkeitsrest vorsichtig suspendiert. Diese Suspension wurde für den Konjugationsprozess als ein einzelner

Tropfen auf eine Agarplatte gegeben, welche einen Zusatz von 50 µg/ml ALA enthielt. Für die Konjugation wurden sowohl hMB- als auch LB+hs-Agarplatten getestet. Nach Auftropfen der Bakteriensuspension wurden die Agarplatten 24 bzw. 48 h bei 30 °C inkubiert.

Zur Bestimmung der Konjugationseffizienz wurde der Konjugationsansatz von der Agarplatte geschabt, in 1 ml MB-Medium suspendiert und eine dezimale Verdünnungsreihe mit 1,7%iger (w/v) Meersalz-Lösung erstellt. Einhundert µl der jeweiligen Verdünnung wurden auf einer hMB-Agarplatte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausplattiert, um die Zahl der Transkonjuganten pro ml zu ermitteln. Zusätzlich wurden 100 µl derselben Verdünnung auf eine Antibiotika-freie hMB-Agarplatte ausgestrichen, um die Gesamtzahl lebender Zellen zu ermitteln. Durch den Verzicht auf ALA im Medium war das Wachstum ALA-auxotropher *E. coli* ST18 Zellen nicht möglich. So konnten nach erfolgter Inkubation (30 °C für 2 Tage sowie bis zu 5 weitere Tage bei RT) ausschließlich Kolonien von *Roseobacter* Zellen ausgezählt werden. Die Konjugationseffizienz ließ sich im Anschluss aus dem Verhältnis von Konjuganten zu lebenden Zellen ermitteln.

3.6.8 Bestimmung der Plasmidstabilitäten in Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe

Die Stabilität der über Konjugation aufgenommenen Plasmide in Zellen der *Roseobacter*-Gruppe wurde überprüft, indem 5 ml MB-Medium mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Konjuganten inokuliert wurden. Die Kultur wurde bei 30 °C und 200 rpm bis zum Erreichen der Stationärphase inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Kultur auf hMB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen. Zur Kontrolle des Wachstums wurden 100 µl derselben Kultur auf Antibiotika-freien hMB-Agarplatten ausgestrichen. Weitere 50 µl dieser Kultur wurden verwendet um 5 ml frisches MB-Medium zu inokulieren, welches bei 30 °C und 200 rpm bis zum Erreichen der Stationärphase inkubiert wurde. Die verbleibende Kultur wurde für eine Plasmidpräparation verwendet, welche anschließend für einen gelelektrophoretischen Nachweis verwendet wurde. Die Passage der Zellen in jeweils 5 ml frisches MB-Medium sowie die Subkultivierung auf hMB-Agarplatten und Plasmidpräparation erfolgten für jedes Plasmid jeweils zehnmal.

3.6.9 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mittels der alkalischen Lyse-Methode (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Um die Plasmide aus den Bakterien zu isolieren, wurden Zellen aus 4 ml einer Kultur sedimentiert (5 min, 12.100 g, 4 °C) und in 300 µl eiskaltem Puffer-P1 suspendiert. Anschließend wurden 300 µl Puffer-P2 hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 2 min bei RT inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 300 µl kaltem Puffer-P3. Es wurde erneut vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 12.100 g, 4 °C) und der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der Überstand mit einem Volumen Isopropanol gemischt, für 10 min bei -20 °C inkubiert und sedimentiert (15 min, 12.100 g, 4 °C). Die sedimentierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Sediment getrocknet, bevor die Plasmid-DNA in 50 µl dest. H₂O gelöst wurde. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Puffer-P1 (pH 8,0)	50,0	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	10,0	mM	EDTA (pH 8,0)
	10,0	µg/ml	RNase A
	in dest. H ₂ O		
Puffer-P2	200,0	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
	in dest. H ₂ O		
Puffer-P3 (pH 5,5)	3	M	Kaliumacetat
	in dest. H ₂ O, Titrationsreagenz: Essigsäure		

3.6.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte durch die Messung der Extinktion bei 260 nm im NanoDrop-Photometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Eine Extinktion von 1 wurde dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA gleichgesetzt. Die Reinheit der jeweiligen Lösung ergab sich aus dem Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm. Dabei sprach ein Verhältnis von 1,8 für eine reine DNA-Lösung und ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Lösung.

3.6.11 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels Restriktionsenzymen von New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA). Reaktionspuffer, die Konzentrationen der eingesetzten DNA und Enzyme sowie die Inkubationstemperatur orientierten sich an den Empfehlungen des Herstellers. Die Restriktion erfolgte für 3 h. Wenn nötig wurde die Aktivität der Enzyme im Anschluss durch Hitzeinaktivierung nach Herstellerangaben gestoppt.

3.6.12 DNA-Gelelektrophorese

Für die Separation von DNA-Fragmenten wurden je nach erwarteter Fragmentgröße 1 - 2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der *Gene-Ruler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, Burlington, Canada) oder der *Mass-Ruler™ DNA Ladder Mix* (Fermentas, Burlington, Canada). Bei ihrer Verwendung wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte abhängig von der Größe des Agarosegels mit einer Spannung von 90 - 120 V. Nach der Elektrophorese wurden das Agarosegel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid gefärbt. Dadurch wurden DNA-haltige Gelbereiche durch Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 312 \text{ nm}$ visualisiert und über eine Geldokumentationsanlage digitalisiert.

TAE-Puffer	40,0	mM	Trisacetat (pH 8,0)
	1,0	mM	EDTA (pH 8,0)
	in deion. H ₂ O		
Agarose-Gel	1,0 – 2,0	% (w/v)	Agarose
	in TAE-Puffer		
Ethidiumbromidlösung	0,1	% (w/v)	Ethidiumbromid
	in deion. H ₂ O		
Probenpuffer (10x)	350,0	μM	Bromphenolblau
	450,0	μM	Xylen Cyanol FF
	0,25	% (w/v)	Orange G
	115,0	μM	Saccharose
	in dest. H ₂ O		

3.6.13 Messung der Fluoreszenzintensität von mit pRhokHi-2-FbFP transformierten Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe

Zum Nachweis der Fluoreszenzintensitäten von mit pRhokHi-2-FbFP transformierten Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe wurden 5 ml hMB-Medium, die den entsprechenden Zusatz an Kanamycin enthielten, mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Stammes inokuliert. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 30 °C und 200 rpm. Als Negativkontrolle wurde der jeweilige Wildtyp-Stamm unter identischen Bedingungen kultiviert, um eine mögliche Eigenfluoreszenz der Zellen berücksichtigen zu können. Im Anschluss an die Kultivierung wurde die optische Dichte bestimmt und die Zellen daraufhin so mit 1,7%iger (w/v) Meersalz-Lösung verdünnt, dass die OD_{578nm} der Zellsuspension 0,7 betrug. Die Messung der Fluoreszenzintensität der Kulturen erfolgte im Lumineszenz-Spektrometer. Die Anregungswellenlänge lag bei 450 nm, die Emission wurde in einem Bereich von 475 - 550 nm gemessen. Anschließend wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten transformierter *Roseobacter* Stämme zu dem jeweiligen Wildtyp-Stamm bestimmt.

3.6.14 Microarray-Analysen

3.6.14.1 Wachstumsbedingungen zur Präparation von *Dinoroseobacter shibae* Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen

Fünf ml SW-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *D. shibae* inokuliert und 24 h bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden 50 ml SW-Medium, welches je nach darauffolgender Kultivierung einen Zusatz von 10 mM Arginin oder 25 mM Kaliumnitrat enthielt, inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm für 36 h unter aeroben Bedingungen kultiviert. Mit diesen Vorkulturen wurden folgende Ansätze inokuliert:

Aerobes Wachstum

Dreißig ml SW-Medium wurden mit einer Vorkultur ohne Zusatz inokuliert. Die Start-OD_{578nm} betrug 0,05. Die Kultivierung erfolgte aerob in einem 100 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 200 rpm für 20 h.

Anaerobes Wachstum mit Arginin

Einhundertfünfundvierzig ml SW-Medium mit einem Zusatz von 10 mM Arginin wurden mit einer Vorkultur, die ebenfalls 10 mM Arginin enthielt, inokuliert. Die Start-OD_{578nm}

betrug 0,05. Die Kultivierung erfolgte anaerob in Transfusionsflaschen mit Septum und Schraubverschluss bei 30 °C und 100 rpm für 7 h.

Anaerobes Wachstum mit Kaliumnitrat

Einhundertfünfundvierzig ml SW-Medium mit einem Zusatz von 25 mM Kaliumnitrat wurden mit einer Vorkultur, die ebenfalls 25 mM Kaliumnitrat enthielt, inokuliert. Die Start-OD_{578nm} betrug 0,05. Die Kultivierung erfolgte anaerob in Transfusionsflaschen mit Septum und Schraubverschluss bei 30 °C und 100 rpm für 10 h.

Jede der oben aufgeführten Kultivierungen wurde einmal unter Ausschluss von Licht sowie einmal mit einer konstanten Beleuchtung von durchschnittlich 400 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\cdot\text{s}$ durchgeführt. Unter jeder Bedingung wurden drei voneinander unabhängige Replikate kultiviert. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm kontrolliert und die Zellen in der logarithmischen Phase geerntet. Dazu wurden 2 ml der aeroben Kulturen bzw. 5 ml der anaeroben Kulturen mit dem doppelten Volumen *RNAprotect*-Lösung (*RNAprotect Bacteria Reagent Kit*, Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und entsprechend der Herstellerangaben präpariert (*RNAprotect* Handbuch, Protokoll 2). Die sedimentierten Zellen konnten so in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

3.6.14.2 Isolierung von Gesamtzell-RNA aus *Dinoroseobacter shibae*

Die eingefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem *RNeasy Mini-Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben lysiert (*RNAprotect* Handbuch, Protokoll 2) und die erhaltene RNA anschließend gereinigt (*RNAprotect* Handbuch, Protokoll 7). Nach einer zweifachen Inkubation mit DNaseI (*RNase-free DNase Set*, Qiagen, Hilden, Deutschland), welche nach Herstellerangaben durchgeführt wurde (*RNAprotect* Handbuch, Appendix B), erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt (*RNAprotect* Handbuch, Protokoll 7). Die Elution der RNA von der Reinigungssäule erfolgte in zwei Schritten mit insgesamt 50 μl RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der erhaltenen RNA-Lösung wurde photometrisch mittels NanoDrop-Photometer bestimmt (Kap. 3.6.10). Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

3.6.14.3 Bestimmung der Qualität von *Dinoroseobacter shibae* Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen mittels Bioanalyzer

Die Qualität der präparierten Gesamtzell-RNA für Microarray-Analysen wurde mittels eines Bioanalyzers in Kombination mit einem RNA Nano Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bestimmt. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren. Eine Qualitätsbewertung mittels RIN (RNA-Integritäts-Nummer, *RNA-Integrity-Number*) war aufgrund prozessierter 23S rRNA nicht möglich, so dass für Microarray-Analysen Gesamtzell-RNA gewählt wurde, die nach visuellen Gesichtspunkten keine Degradierung aufwies.

3.6.14.4 Fluoreszenzmarkierung von *Dinoroseobacter shibae* Gesamtzell-RNA

Die isolierte RNA wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 markiert und anschließend gereinigt. Die Durchführung erfolgte mittels *ULSTM Fluorescent Labeling Kit for Agilent arrays* (KREATECH Biotechnology, Amsterdam, Niederlande) nach Angaben des Herstellers (Kap. CIII, Teil a und b).

3.6.14.5 Bestimmung der Fluoreszenzmarkierungseffizienz

Die Einbaueffizienz der Farbstoffe Cy3 bzw. Cy5 in pmol/μl und die Konzentration der gereinigten, markierten RNA wurde mit dem NanoDrop-Photometer bestimmt. Dazu wurde am Gerät die Einstellung „Microarray“ gewählt. Die Einbaueffizienz des Fluoreszenzfarbstoffes DOL (*Degree of labeling*) wurde folgendermaßen berechnet:

$$Labelling\% = \frac{340 \cdot pmol/\mu l_{dye}}{ng/\mu l_{DNA} \cdot 1000} \cdot 1000$$

Ein optimaler DOL lag nach Herstellerangaben (KREATECH Biotechnology, Amsterdam, Niederlande) zwischen 1,0 und 3,6 % vor. Bei nicht ausreichendem DOL wurde die Markierung wiederholt.

3.6.14.6 Fragmentierung und Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten *Dinoroseobacter shibae* Gesamtzell-RNA

Für die 8 x 15K *D. shibae* Microarrays von Agilent wurde die Fragmentierung und Hybridisierung nach Schritt 2 des *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Jeder

Fragmentierungsansatz enthielt 300 ng Cy3-markierte und 300 ng Cy5-markierte RNA. Vom 50 µl-Gesamtvolumen der Probe wurden 40 µl luftblasenfrei in die entsprechenden Deckglasträger ((G2534-60015); Agilent Technologies, Santa Clara, USA) überführt. Der Microarray-Slide (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurde aufgelegt und mittels Hybridisierungskammer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurden Chip und Deckglasträger fixiert. Die Inkubation erfolgte für 17 Stunden bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen bei 10 rpm. Nach erfolgter Hybridisierung wurde der Microarray-Slide von dem Deckglasträger getrennt. Dazu wurden die aneinanderhaftenden Teile in Waschpuffer 1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit einer Pinzette auseinandergezogen. Anschließend wurde der Microarray-Chip 1 min in Waschpuffer 1 und 1 min in auf 37 °C temperiertem Waschpuffer 2 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gewaschen. Der Scan erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation.

3.6.14.7 Scan von Microarrays

Microarrays wurden mit dem *High-Resolution Microarray Scanner* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gescannt. Dabei wurde nach Vorschrift des Herstellers verfahren.

3.6.14.8 Auswertung von Microarray-Daten

Die Microarrays wurden mit Hilfe des Programms „R“ durch Nutzung von „*Bioconductor*“ prozessiert (www.bioconductor.de; Gentleman *et al.*, 2004). Die Prä-Prozessierung basierte auf dem „marray“-Package durch Nutzung der „*read.Agilent*“ Funktion. Aufgrund der Nutzung von Agilent Microarray-Chips wurde der Kontroll-Code adaptiert und die Microarrays zur Qualitäts-Kontrolle auf Artefakte und große Unterschiede innerhalb der Replikate untersucht. Die 2-Kanal-Normalisierung wurde durch eine „Loess“-Normalisierung vorgenommen (Yang und Paquet, 2005). Differentiell exprimierte Gene wurden durch das „limma“-Package unter Nutzung von „lmFit“ für lineares Modelling, „eBayes“ für Signifikanz-Kalkulationen und „TopTable“ für die Extraktion der differentiell exprimierten Gene erhalten. Die „Top Table“ wurde mit allen Sonden erstellt, deren $\log_2(\text{FC}) \geq 1,0$ betrug. Die Zusammenfassung der verschiedenen Sonden für jedes Gen erfolgte durch die Kalkulation der Median-Werte.

3.7 Biochemische Techniken

3.7.1 Enzymatische Reinigung von Chitin

Um kommerzielles Chitin aus Krabbenschalen für die Kultivierung von *D. shibae* zu verwenden, musste dieses vor Zugabe zu dem Kulturmedium von möglichen anhaftenden Proteinen gereinigt werden. Hierfür wurden 5 g Chitin zu 50 ml Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 7,5, 2 mM MgCl_2) gegeben und nach Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ frisch hergestellter Proteinase K-Lösung (in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) für 24 h bei 36 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde das Chitin sedimentiert (5 min, 3.345 g, RT), gefolgt von zwei Waschschritten mit MilliQ H_2O . Anschließend wurde das Sediment für 24 h bei 60 °C getrocknet und im Trockenvakuum sterilisiert.

3.7.2 Bestimmung von extrazellulären Enzymaktivitäten mittels Substratarplatten

Für die Bestimmung von extrazellulären Enzymaktivitäten mittels Substratarplatten wurden 5 ml MB-Medium mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterientammes aus der *Roseobacter*-Gruppe inokuliert und 24 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Filtration abgetrennt (Porendurchmesser des Filters 0,2 μm) und 50 μl des sterilfiltrierten Überstandes in zuvor ausgestanzte Löcher ($\varnothing = 0,5 \text{ cm}$) einer Substratarplatte gegeben. Zusätzlich wurden die jeweiligen Bakterienstämme aus einer Glycerin-Gefrierkultur direkt auf eine Substratarplatte ausgestrichen. Die Substratarplatten wurden für zwei Tage bei 30 °C und im Anschluss für bis zu fünf weitere Tage bei RT inkubiert. Hierbei orientierte sich die Inkubationszeit sowohl an der Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Bakterienstammes, als auch an der Umsetzungsgeschwindigkeit der untersuchten Enzyme. Bei Aktivität des jeweiligen getesteten Enzyms erfolgte eine Umsetzung des Substrats im Agar, welche visuell erfasst werden konnte. Für jeden Stamm wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.7.2.1 Alginate-Lyase-Aktivitätsbestimmung

Der Nachweis von Alginate-Lyase-Aktivität erfolgte auf MB-Agarplatten mit 2 mg/ml Alginate. Die Agarplatten wurden 48 h bei 30 °C und anschließend bis zu fünf Tage bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurden die Platten mit einer 10%igen FeCl_3 -Lösung (w/v) überschichtet. Nach einigen Minuten zeigten Alginate-Lyase-positive Stämme eine helle

Zone in unmittelbarer Umgebung der ausgestanzten Löcher bzw. der ausgestrichenen Kulturen.

3.7.2.2 Chitinase-Aktivitätsbestimmung

Der Nachweis von Chitinase-Aktivität erfolgte auf MB-Agarplatten mit 0,08 % (w/v) Chitin-Azur (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die Agarplatte wurde bis zu drei Wochen bei 30 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Eine Entfärbung des Chitin-Azur in unmittelbarer Umgebung der ausgestanzten Löcher bzw. der ausgestrichenen Kultur wurde als positiver Nachweis gewertet.

3.7.2.3 DNase-Aktivitätsbestimmung

Der Nachweis von DNase-Aktivität erfolgte auf DNase Testagar mit Methylgrün (Difco Inc, Detroit, USA). Dieser wurde nach den Herstellerangaben angesetzt, jedoch wurde MB-Medium anstelle von Wasser verwendet. Die Agarplatte wurde für 48 h bei 30 °C und im Anschluss bis zu fünf Tage bei RT inkubiert. Eine Entfärbung der Substratarplatte in unmittelbarer Umgebung der ausgestanzten Löcher bzw. der ausgestrichenen Kultur wurde als positiver Nachweis der DNase-Aktivität gewertet.

3.7.2.4 Elastase-Aktivitätsbestimmung

Der Nachweis von Elastase-Aktivität erfolgte auf MB-Agarplatten mit 0,1 % (w/v) Elastin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die Agarplatte wurde für 48 h bei 30 °C und im Anschluss bis zu fünf Tage bei RT inkubiert. Die Entstehung klarer Bereiche der Substratarplatte in unmittelbarer Umgebung der ausgestanzten Löcher bzw. der ausgestrichenen Kultur wurde als positiver Nachweis der Elastase-Aktivität gewertet.

3.7.2.5 Hämolyisin-Aktivitätsbestimmung

Der Nachweis von Hämolyisin-Aktivität erfolgte auf MB-Agarplatten mit 5 % (v/v) Schafsblut (Acila, Weiterstadt, Deutschland). Das Schafsblut wurde dem MB-Agar nach Sterilisation zugegeben, sobald dieser eine Temperatur von 50 °C erreicht hatte, um eine Denaturierung der darin enthaltenen Proteine zu verhindern. Die Agarplatte wurde für 48 h bei 30 °C und im Anschluss bis zu fünf Tage bei RT inkubiert. Die Entstehung klarer Bereiche der Substratarplatte in unmittelbarer Umgebung der ausgestanzten Löcher bzw. der ausgestrichenen Kultur wurde als positiver Nachweis der Hämolyisin-Aktivität gewertet.

3.7.2.6 Phospholipase A- und C-Aktivitätsbestimmung

Der Nachweis von Phospholipase-Aktivität erfolgte auf Phospholipase A- und C-Testagar. Die Agarplatte wurde für 48 h bei 30 °C und im Anschluss bis zu fünf Tage bei RT inkubiert. Die Entstehung klarer Bereiche der Substratarplatte in unmittelbarer Umgebung der ausgestanzten Löcher bzw. der ausgestrichenen Kultur wurden als positiver Nachweis für Phospholipase C-Aktivität gewertet. Eine zusätzliche Trübung des bereits ursprünglich getrübbten Substratagars war ein Nachweis für Phospholipase A-Aktivität.

Phospholipase A- und C -Testagar	50	mM	Natriumacetatpuffer, pH 7,5
	10	µmM	CaCl ₂
	1,5	% (w/v)	Agar
	in deion. H ₂ O		
<i>nach Sterilisation und Abkühlen</i>			
<i>auf 50 °C Zugabe von</i>	1	% (v/v)	steriles Eigelb (Acila, Weiterstadt, Deutschland)

3.7.2.7 Protease-Aktivitätsbestimmung

Der Nachweis von Protease-Aktivität erfolgte auf MB-Agar mit 5 % (w/v) Magermilchpulver. Die Agarplatte wurde für 48 h bei 30 °C und im Anschluss bis zu fünf Tage bei RT inkubiert. Die Entstehung klarer Bereiche der Substratarplatte in unmittelbarer Umgebung der ausgestanzten Löcher bzw. der ausgestrichenen Kultur wurde als positiver Nachweis für Protease-Aktivität gewertet.

3.7.3 Photometrische Methoden zur Bestimmung von extrazellulären Enzymaktivitäten

Für die photometrische Bestimmung von Enzymaktivitäten wurden 5 ml MB-Medium mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterienstammes aus der *Roseobacter*-Gruppe inokuliert und 24 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Für die Durchführung der Bestimmungen wurde entweder die Bakterienkultur oder der zellfreie Überstand verwendet (siehe 3.7.2). Für jeden Stamm wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.7.3.1 Alginate-Lyase-Aktivitätsbestimmung

Zur Alginate-Lyase-Aktivitätsbestimmung wurden 150 µl Probelösung mit 350 µl Substratlösung vermischt und bei 37 °C bis zu 120 min inkubiert. Anschließend wurde die

Material und Methoden

Enzymreaktion durch Erhitzen für 1 min auf 100 °C gestoppt und die Proben auf Eis gelagert. Die entstandenen reduzierenden Zuckerenden des Alginats wurden mittels Thiobarbitursäure-Test nachgewiesen (Weissbach und Hurwitz, 1959). Dazu wurden 200 µl der Probe mit 250 µl Perjodsäurelösung versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Arsenitlösung zugegeben, bis zur Entfärbung der Probe gewartet und dann 2 ml Thiobarbitursäure-Lösung hinzugefügt. Nach Durchmischen der Probe wurde diese 10 min bei 100 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf RT wurde die Absorption bei 548 nm gemessen. Als Nullwert wurde ein Ansatz, der anstelle der Probe 150 µl 140 mM NaCl-Lösung enthielt, gleich behandelt und vermessen. Eine Enzymeinheit (U) wurde definiert als die Enzymaktivität, die unter den beschriebenen Testbedingungen 1 nmol β -Formylpyruvat pro min freisetzt. Zehn nmol β -Formylpyruvat entsprechen dabei einer Absorption bei 548 nm von 0,29 (Preiss und Ashwell, 1962).

Substratlösung	286 in 1 mit 30	mg ml mM	Alginat Tris-HCl Puffer (30 mM; pH 7,5) MgCl ₂
Perjodsäurelösung	25 in 62,5	mM mM	H ₅ JO ₆ H ₂ SO ₄
Arsenitlösung	2 in 500	% (w/v) mM	NaAsO ₂ HCl
Thiobarbitursäure-Lösung	0,3 in deion. H ₂ O	% (v/v)	Thiobarbitursäure

3.7.3.2 Alkalische Phosphatase-Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivität alkalischer Phosphatasen wurden 50 µl Probelösung mit 950 µl frischem Substratpuffer gemischt, und die Absorption bei 410 nm gemessen. Eine zweite Messung erfolgte nach 30-minütiger Inkubation bei RT. Als Nullwert wurde ein Ansatz, der anstelle der Probe 50 µl 140 mM NaCl-Lösung enthielt, gleich behandelt und vermessen. p-Nitrophenylphosphat wurde hierbei enzymatisch zu p-Nitrophenol gespalten. Für den Konzentrationsbereich von 0 bis 50 µM p-Nitrophenol wurde eine Kalibriergerade in Tris-HCl Puffer (100 mM; pH 10,0; 10 mM MgCl₂) aufgenommen.

Substratpuffer	3,7	mg	p-Nitrophenylphosphat
	in 10	ml	Tris-HCl Puffer (100 mM; pH 10,0)
	mit 10	mM	MgCl ₂

3.7.3.3 Esterase-Aktivitätsbestimmung

In einer Küvette (1 cm Schichtdicke) wurden 900 µl Kaliumphosphatpuffer (200 mM, pH 6,5) mit 50 µl p-Nitrophenylacetat (20 mM, in 100%igem Ethanol) und 50 µl der zu testenden Probe gemischt. Die Lösung wurde sofort und über einen Zeitraum von einer Stunde alle 10 min bei 410 nm photometrisch vermessen. Zwischen den Messungen wurde der Ansatz bei 30 °C inkubiert. Durch enzymatische Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat entstand p-Nitrophenol. Der Extinktionskoeffizient betrug $\varepsilon = 15 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$, so dass mit Hilfe der Formel

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot d}$$

die Menge an gebildetem p-Nitrophenol berechnet werden konnte. Ein Unit (U) Esterase entsprach dabei der Menge Enzym, die 1 µmol p-Nitrophenol pro Minute freisetzte (Musidlowska-Persson und Bornscheuer, 2003).

3.7.3.4 Lipase-Aktivitätsbestimmung

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 30 mg p-Nitrophenylpalmitat unter vorsichtigem Erwärmen in 10 ml Isopropanol gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurde diese unter schwachem Rühren zu 90 ml Sørensen-Phosphat-Puffer, in welchem zuvor 207 mg Natriumdesoxycholat und 100 mg Gummi arabicum gelöst wurden, gegeben. Die Substratemulsion wurde lichtgeschützt gelagert und innerhalb einer Stunde nach ihrer Herstellung verwendet. 2,4 ml Substratemulsion wurden 3 min bei 37 °C erwärmt und dann mit 200 µl Probelösung gemischt. Die Absorption der Probe wurde direkt und nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C im Dunkeln bestimmt. Als Nullwert wurde ein Ansatz, der anstelle der Probe 200 µl 140 mM NaCl-Lösung enthielt, genauso behandelt und vermessen. p-Nitrophenylpalmitat wurde hierbei enzymatisch gespalten, wobei p-Nitrophenol entstand. Für den Konzentrationsbereich 0 bis 50 µM p-Nitrophenol wurde eine Kalibriergerade in Tris-HCl Puffer (100 mM; pH 10,0; 10 mM MgCl₂)

aufgenommen.

Sørensen-Phosphat-Puffer, pH 8,0

Lösung 1:	50	mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Lösung 2:	50	mM	KH_2PO_4

Kurz vor Gebrauch wurden 94,5 ml Lösung 1 mit 5,5 ml Lösung 2 gemischt.

3.7.3.5 Protease-Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Protease-Aktivität wurden 150 µl der Probelösung mit 50 µl Tris-HCl Puffer (1 M; pH 8,0) und 50 µl deion. H_2O gemischt und 5 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl auf 30 °C vortemperierter 2%iger (w/v) Azocaseinlösung wurde die Lösung 20 min bei 30 °C inkubiert und anschließend mit 1 ml eiskalter 7%iger (v/v) Perchlorsäure versetzt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (4 min, 8.000 g, RT), der Überstand mit 150 µl 10 M NaOH-Lösung versetzt und die Absorption bei 430 nm gemessen. Als Nullwert diente hierbei ein Ansatz, der anstelle der Probelösung 150 µl 140 mM NaCl-Lösung enthielt und gleich behandelt und vermessen wurde. Eine Enzymeinheit [U] extrazellulärer Protease wurde als die Aktivität in 1 ml definiert, die in 60 min eine $\Delta\text{Absorption}_{430\text{nm}} = 1,0$ bewirkte (Obernesser *et al.*, 1981).

3.7.3.6 Glukose-6-Phosphatdehydrogenase Aktivitätstest

Um die Anwesenheit größerer Mengen cytoplasmatischen Proteins aus lysierten Zellen auszuschließen, wurde mit den zellfreien Überständen aus Kapitel 1.6.3 ein Glukose-6-phosphatdehydrogenase- (G6PD) Aktivitätstest durchgeführt. G6PD ist ein Enzym aus dem Pentosephosphatweg, welches die Dehydrogenierung von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton unter Generierung von NADPH katalysiert. Fünfzig µl der Probelösung wurden dazu mit 1,45 ml Substratlösung gemischt und 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Inkubation wurde alle 15 min die Absorptionzunahme bei 340 nm gemessen. Als Positivkontrolle diente G6PD aus *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), als Negativkontrolle Tris-HCl Puffer (120 mM; pH 8,6). Zeigte der zellfreie Überstand keine oder nur sehr geringe G6PD-Aktivität, wurde angenommen dass der Überstand vorwiegend extrazelluläres Protein enthielt, dessen Zusammensetzung im weiteren Verlauf untersucht wurde.

G6PD-Lösung	1 µg/ml G6PD in MilliQ H ₂ O
Substratlösung	500 µl Tris-HCl (120 mM; pH 8,6) 375 µl Glukose-6-phosphat-Lösung (20 mM) 25 µl β-NADP-Lösung (10 mM) 90 µl MgCl ₂ -Lösung (250 mM) 235 µl MilliQ H ₂ O

3.7.4 Methoden zur Fällung extrazellulärer Proteine aus *Dinoroseobacter shibae*

3.7.4.1 Wachstumsbedingungen für *Dinoroseobacter shibae* zur Gewinnung extrazellulärer Proteine

Fünf ml MB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *D. shibae* inokuliert und 24 h bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Mit 1 ml dieser Kultur wurden jeweils 50 ml MB-Medium, MB-Medium mit einem Zusatz von 0,1 % (w/v) gereinigtem Chitin (Kap. 3.7.1) sowie SW-Medium und SW-Medium mit einem Zusatz von 0,1 % (w/v) gereinigtem Chitin (Kap. 3.7.1) inokuliert. Die Kultivierung erfolgte für etwa 40 h bei 30 °C und 200 rpm. Nachdem sich die Kultur 4 h in der Stationärphase befand, wurde sie zur Gewinnung des zellfreien Kulturüberstandes verwendet.

3.7.4.2 Gewinnung von zellfreien Überständen von *Dinoroseobacter shibae* Kulturen für die Fällung extrazellulärer Proteine

Zur Gewinnung des zellfreien Überstandes aus *D. shibae* Kulturen wurden die Zellen nach der Kultivierung sedimentiert (20 min, 3.000 g, 4 °C). Anschließend wurde zu dem Überstand eine Tablette Proteaseinhibitor zugegeben (*complete mini, EDTA-free*, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und gelöst. Daraufhin wurde der Überstand sterilfiltriert (0,22 µm, *Millipore Express Plus Membrane*, Millipore, Billerica, USA). Dieser Überstand konnte dann für die Bestimmung der G6PD-Aktivität (Kap. 3.7.3.6) oder für verschiedene Proteinfällungen (siehe Kap. 3.7.4.3 bis 3.7.4.8) verwendet werden. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

3.7.4.3 Acetonfällung

Der zellfreie Überstand wurde mit dem vierfachen Volumen eiskaltem Aceton versetzt und gut gemischt. Im Anschluss wurde die Lösung für 1 h bei -20 °C gelagert. Gefälltes Protein wurde sedimentiert (16.000 g, 30 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Sediment in

MilliQ H₂O gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Proteinlösung bei -20 °C gelagert.

3.7.4.4 Ammoniumsulfatfällung

Aus dem zellfreien Überstand wurden Proteine durch die gleichmäßige Zugabe von feingemörsertem Ammoniumsulfat bis zur vollständigen Sättigung bei 4 °C unter langsamen Rühren gefällt. Nach Beendigung der Fällung wurde die Lösung eine weitere Stunde bei 4 °C gerührt. Gefälltes Protein wurde sedimentiert (16.000 g, 30 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Sediment in MilliQ H₂O gelöst. Zur Entfernung überschüssigen Salzes wurde die Proteinlösung gegen MilliQ H₂O dialysiert. Probevolumen bis zu 800 µl wurden in Mikrodialysierkapseln (H449.1; Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefüllt, größere Volumina in Dialyseschläuche, die mit Klammern verschlossen wurden. Der verwendete Dialyseschlauch (Roth, Karlsruhe, Deutschland) hatte ein Ausschlussvolumen von 10 kDa. Die Dialyse erfolgte fünfmal im Verhältnis 1:500 für 30 min bei 4 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Proteinlösung bei -20 °C gelagert.

Die zur vollständigen Sättigung einer Lösung zuzugebende Menge Ammoniumsulfat berechnete sich nach folgender Formel:

$$m_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{\rho_{\text{sat.}} \cdot (c_2 - c_1)}{\rho_{\text{sat.M}} - \left(\frac{V_{\text{spez.}}}{132,14 \cdot 10^3 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot \rho_{\text{sat.M}} \cdot C_2} \right)}$$

mit:

$\rho_{\text{sat.}}$	=	Konzentration (NH ₄) ₂ SO ₄ in gesättigter Lösung [g/l]
$\rho_{\text{sat.M}}$	=	Konzentration einer gesättigten (NH ₄) ₂ SO ₄ -Lösung [g/l]
c_1	=	(NH ₄) ₂ SO ₄ -Konzentration der Ausgangslösung [mol/l]
c_2	=	gewünschte Konzentration (NH ₄) ₂ SO ₄ [mol/l]
$V_{\text{spez.}}$	=	spezifisches Volumen (NH ₄) ₂ SO ₄ [ml/g]
$M_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$	=	132,14 g/mol

Das spezifische Volumen von Ammoniumsulfat beträgt 565 µl/g. Die Molarität einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bei 4 °C beträgt 3,93 M.

3.7.4.5 Konzentrierung Ammoniumsulfat-gefällter Proteine

Die Proteinkonzentrierung der Proben wurde für Volumina ≥ 10 ml durch Ultrafiltration in einer *Amicon stirred cell* (Modell 8010 bzw. 8050) durchgeführt. Dabei wurde die Lösung mit 2,5 bar Druck durch eine *Ultracel Ultrafiltration Membrane* (Millipore, Billerica USA) filtriert. Das Ausschlussvolumen der Membran betrug 10 kDa. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proteinprobe wurde auf ca. 10 % ihres Ausgangsvolumens eingeeengt.

Für Probevolumina zwischen 2 und 10 ml wurden *Vivaspin Columns 6* bzw. *20* (GE Healthcare Europe, München), für Probevolumina ≤ 2 ml *Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filters* (Millipore, Bilerica, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Auch hierbei betrug das Ausschlussvolumen 10 kDa, die Probe wurden ebenfalls auf ca. 10 % ihres Ausgangsvolumens konzentriert.

3.7.4.6 Chloroform-Methanol-Fällung

Der zellfreie Überstand wurde mit dem vierfachen Volumen an eiskaltem Methanol und einem Volumen eiskaltem Chloroform versetzt. Die Lösung wurde gut gemischt, mit einem halben Volumen MilliQ H₂O versetzt und wiederum gut gemischt. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (2 min, 16.000 g, 4 °C), der Überstand abgenommen und verworfen. Zu der verbleibenden Lösung wurde ein Volumen Methanol gegeben und gut gemischt. Präzipitiertes Protein wurde sedimentiert (5 min, 16.000 g, 4 °C), der Überstand entfernt und das Sediment bei RT getrocknet. Anschließend wurde das sedimentierte Protein in MilliQ H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.7.4.7 Hitzefällung

Der zellfreie Überstand wurde 15 min unter Schütteln auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe auf RT abgekühlt, präzipitiertes Protein bei 16.000 g sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in MilliQ H₂O gelöst, und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.7.4.8 Polyethylenglykol (PEG)-Fällung

Aus dem zellfreien Überstand wurden Proteine durch die gleichmäßige Zugabe von PEG (10 % (w/v) PEG 6000) bei 4 °C unter Rühren ausgefällt. Anschließend wurde die Lösung 2 h bei 4 °C nachgerührt. Präzipitiertes Protein wurde sedimentiert (30 min, 16.000 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 70%igem (v/v) Ethanol

gewaschen und erneut sedimentiert (5 min, 16.000 g, 4 °C). Das sedimentierte Protein wurde in MilliQ H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.7.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung der in Kapitel 3.7.4 gewonnen Proteingemische aus Kulturüberständen wurden in dieser Arbeit 6%ige Sammelgele und 12%ige Trenngele eingesetzt. Die Gele mit einer Größe von 7 cm x 10 cm x 0,75 mm wurden mit Hilfe des *Mini Protean 3 Systems* (BioRad, München, Deutschland) gegossen. Tabelle 5 zeigt das Pipettierschema zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele.

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung von vier SDS-Polyacrylamid-Gelen.

Lösung	Sammelgel, 6 % (v/v) V [ml]	Trenngel, 12 % (v/v) V [ml]
Acrylamid-Stocklösung	2	
Sammelgelpuffer	2,5	-
Trenngelpuffer	-	5
deion. H ₂ O	5,5	7
APS-Lösung	0,01	0,02
TEMED	0,1	0,2

Für die Elektrophorese wurden 40 µl Proteinlösung mit 15 µl Probenpuffer versetzt und das Proteingemisch 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde es zusammen mit dem *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (MBI Fermentas, Burlington, Canada) auf das Gel aufgetragen und die Proteine 60 min bei 45 mA in Elektrophoresepuffer getrennt.

Acrylamid-Stocklösung	Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (Roth)
Sammelgelpuffer	0,4 % (w/v) SDS 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) in deion. H ₂ O
Trenngelpuffer	0,4 % (w/v) SDS 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) in deion. H ₂ O
APS-Lösung	10,0 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in deion. H ₂ O

Elektrophoresepuffer	385,0	mM	Glycin
	0,1	% (w/v)	SDS
	50,0	mM	Tris-HCl (pH 8,8)
	in deion. H ₂ O		
Probenpuffer	40,0	% (v/v)	Glycerin
	2,0	mM	β-Mercaptoethanol
	110,0	mM	SDS
	3,0	mM	Bromphenolblau
	100,0	mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	in deion. H ₂ O		

3.7.6 Zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese

Zur Charakterisierung extrazellulärer Proteine aus *D. shibae* wurden die mittels Ammoniumsulfatfällung (siehe 3.7.4.4) isolierten und anschließend konzentrierten (siehe 3.7.4.5) Proteine mittels zweidimensionaler (2D) Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und ihrer relativen Masse aufgetrennt. Im Anschluss wurden sie via MALDI-TOF Analyse identifiziert.

D. shibae wurde dazu in den Medien MB, MB mit 0,1 % (w/v) Chitin, SW-Medium und SW-Medium mit 0,1 % (w/v) Chitin kultiviert. Die aus diesen Kulturen gewonnenen Proteingemische wurden auf 2D-Gelen separiert. Anschließend wurden die 2D-Gele der verschiedenen Ansätze miteinander verglichen. Die Kultivierung von *D. shibae* erfolgte vier mal in 500 ml des jeweiligen Mediums in 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikane. Das Medium wurde mit einer (entsprechend der Durchführung in Kap. 3.7.4.1 hergestellten) 50 ml Vorkultur so inokuliert, dass die StartOD_{578nm} 0,05 betrug und bei 30 °C und 200 rpm ca. 40 h lang kultiviert. Neben den hier aufgeführten Bedingungen wurden zusätzlich zwei Kultivierungsansätze auf ihre extrazellulären Proteine untersucht, die von Frau Dipl.-Biologin Ina Buchholz (HZI, Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurden. Hierbei handelte es sich um den zellfreien Überstand aus der Kultivierung des Dinoflagellaten *Isochrysis galbana*, sowie aus der Cokultivierung von *I. galbana* mit *D. shibae*. Durch den Vergleich dieser beiden Kultivierungsansätze sollten putative Proteine identifiziert werden, die von *D. shibae* sekretiert werden, wenn das Bakterium mit einem Dinoflagellaten assoziiert lebt.

3.7.6.1 Pufferaustausch

Für die 2D-Gelelektrophorese mussten die mit Ammoniumsulfat gefällten Proteine in Rehydratisierungspuffer A vorliegen. Dieser Puffer enthält Harnstoff und Thioharnstoff, welche durch Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen die Aggregation und Ausbildung von Sekundärstrukturen verhinderten. Das Detergenz CHAPS sorgt für eine höhere Löslichkeit der Proteine indem hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben wurden. Das reduzierende Agens DTT reduziert Disulfidbrücken vollständig.

Die Proteinprobe wurde fraktioniert und jeweils 500 µl der Probe wurden mit *Amicon Ultra-0.5 ml Centrifugal Filters* (Millipore, Bilerica, USA) auf ca. 50 µl konzentriert, das Ausgangsvolumen des Konzentrats durch Zugabe von Rehydratisierungspuffer A rekonstituiert und diese Lösung wiederum auf 50 µl konzentriert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, so dass das Protein im Anschluss in Rehydratisierungspuffer A vorlag. Die einzelnen Fraktionen einer Proteinprobe wurden danach vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Rehydratisierungspuffer A	7,0	M	Harnstoff
	2,0	M	Thioharnstoff
	4,0	% (w/v)	CHAPS
	50,0	mM	DTT
	in MilliQ H ₂ O		

3.7.6.2 Bestimmung der Konzentration von extrazellulären Proteinen aus *Dinoroseobacter shibae*

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Plus 2D Quant Kit (GE-Health-care Europe, München, Deutschland) nach Vorschrift verwendet. Dabei wurden abweichend von der Herstellervorschrift lediglich die Kalibrierpunkte für 0, 20 und 40 µg BSA bestimmt.

3.7.6.3 Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung

Von den Proben mit bekannter Proteinkonzentration wurden Probe und Rehydratisierungspuffer A derart gemischt, dass in einem Endvolumen von 200 µl 100 µg Proteine vorlagen. Nach Zugabe von 100 µl Rehydratisierungspuffer B wurde die Probe in eine Rehydratisierungskammer gegeben und pH-Gradientenstreifen (*Ready StripTM IPG Strip* 17 cm, pH 3 - 6 bzw. 3 - 10, Bio-Rad) luftblasenfrei aufgelegt. Nach 1 h wurden die Streifen zum Schutz vor Verdunstung mit 3 ml Mineralöl überschichtet und über Nacht bei RT inkubiert.

Die Proteine diffundierten dabei in das Gel der Streifen.

Rehydratisierungspuffer B: 2,625 ml Rehydratisierungspuffer A
 125,0 μ l Ampholytlösung (pH 3-10)
 1 Spatelspitze Bromphenolblau
 bei -20 °C lagern

3.7.6.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem pI wurden diese, nach erfolgter Diffusion in die pH-Gradientenstreifen, isoelektrisch fokussiert. Für einen besseren Stromfluss wurden mit MilliQ H₂O befeuchtete Stücke Whatman-Papier über den Elektrodendraht der Fokussierungskammer (Bio-Rad, Hercules, USA) gelegt. Die pH-Gradientenstreifen wurden darauf positioniert und mit 3 ml Mineralöl überschichtet. Die Fokussierung erfolgte nach den in Tab. 6 und 7 stehenden Programmen bei 20 °C und einer maximalen Stromstärke von 50 μ A pro Gelstreifen. Für Gradientenstreifen mit pH 3 - 10 wurde die Fokussierung nicht vor Erreichen von 60.000 Vh, für Gradientenstreifen mit pH 3 - 6 nicht vor Erreichen von 40.000 Vh gestoppt, um eine ausreichende Fokussierung zu gewährleisten. Nach der IEF wurden die Streifen direkt für die SDS-PAGE verwendet oder bis zur Verwendung in einer Kunststoffhülle bei -80 °C gelagert.

Tabelle 6: Spannungsverlauf der isoelektrischen Fokussierung für *Ready Strip*TM *IPG Strip* 17 cm, pH 3-10.

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Übergang
1	250	1	schnell
2	500	1	schnell
3	1.000	1	schnell
4	5.000	22	schnell
5	500	99	schnell

Tabelle 7: Spannungsverlauf der isoelektrischen Fokussierung für *Ready Strip*TM *IPG Strip* 17 cm, pH 3-6.

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Übergang
1	250	1	schnell
2	8.000	1	langsam
3	8.000	6,5	schnell
4	250	99	schnell

3.7.6.5 Behandlung der pH-Gradientenstreifen für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Nach erfolgter IEF wurden die pH-Gradientenstreifen für 15 min in jeweils 5 ml Äquilibrationpuffer mit 15 mM DTT schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte zweimalig eine 15-minütige Inkubation in Äquilibrationpuffer mit 150 mM Iodacetamid.

Äquilibrationpuffer 6,7 ml Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)
 72,0 g Harnstoff
 4,0 g SDS
 87,0 g Glycerin
 auf 200 ml auffüllen mit MilliQ H₂O
 1 Spatelspitze Bromphenolblau
 bei -20 °C lagern

3.7.6.6 Gele für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse wurden 20 cm x 30 cm große, 10%ige SDS-Gele in einer speziellen Gelgießapparatur (*Ettan DALT II Gel Caster*, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) vorbereitet. Dazu wurde die Apparatur von unten mit der vorbereiteten Gellösung befüllt. Anschließend wurden etwa 200 ml *Displacing Solution* zugegeben, um eine Polymerisation im Gießschlauch zu verhindern. Die Gelkämme wurden zwischen die Gelplatten gesteckt und die Apparatur mit Folie abgedeckt. Die Gele polymerisierten anschließend für mindestens 2 h und wurden danach direkt verwendet. Das Pipettierschema für die Gellösung ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Pipettierschema für die Herstellung von 14 SDS-Gelen.

Lösung	Konzentration der Stammlösung	V [ml]	Bemerkung
Acrylamid-Stocklösung	30 % (w/v)	400	mischen
Tris-HCl; pH 8,8	1,5 M	300	
MilliQ H ₂ O		480	
SDS	10 % (w/v)	12	
APS	10 % (w/v)	3	Zugabe, 1 min rühren, Gele gießen
TEMED	10 % (v/v)	1	

<i>Displacing Solution</i>	25,0	ml	Tris-HCl (1.5 M; pH 8.8)
	63,0	g	Glycerol
	25,0	ml	MilliQ H ₂ O
			1 Spatelspitze Bromphenolblau

3.7.6.7 SDS-Gelelektrophorese

Die pH-Gradientenstreifen, in denen die fixierten und nach ihrem pI aufgetrennten Proteine vorlagen, wurden luftblasenfrei auf die Geloberkante der SDS-Gele gelegt und mit *Sealing Solution* fixiert. Die Gele wurden in eine SDS-Laufkammer (*Ettan-Dalt-12*; Amersham Pharmacia) gestellt und bei 20 °C und 1 W pro Gel so lange elektrophoretisch getrennt bis sich der blaue Bromphenolstreifen ca. 1 cm über der unteren Gelkante befand. Die Gele wurden anschließend der Laufkammer entnommen und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert (Kap. 3.7.7). Im Anschluss an die Färbung erfolgte die Digitalisierung der Gele.

SDS-Laufpuffer (10 x)	30,25	g	Tris
	144,0	g	Glycin
	10,0	g	SDS
			in 1 l MilliQ H ₂ O

Sealing Solution	25,0	ml	SDS-Elektrophoresepuffer
	125,0	mg	Agarose
			1 Spatelspitze Bromphenolblau
			Agarose durch Erhitzen lösen

3.7.6.8 Entfärbung der Proben für die MALDI-TOF Analyse

Um eine zweite Quervernetzung der silbergefärbten Proteine zu vermeiden und weiterhin die Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF zu ermöglichen, wurden die Proteinspots nach der Färbung so schnell wie möglich wieder entfärbt. Dazu wurde der jeweilige zu analysierende Proteinspot aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Zu den Gelspots wurden 100 µl Entfärbelösung gegeben und diese darin 15 min bei RT inkubiert. Die Farbe der Gelspots änderte sich hierbei von braun zu gelblich bzw. farblos. War dies nicht der Fall, wurde der Entfärbeschritt wiederholt bis eine Entfärbung visuell erkennbar war. Im Anschluss wurden die Proben zur Analyse an die Firma TopLab in München verschickt.

Entfärbelösung	1:1 Gemisch aus Lösung A und B vor Gebrauch frisch hergestellt
Lösung A	30 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in MilliQ H_2O dunkel lagern
Lösung B	100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in MilliQ H_2O

3.7.6.9 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde von der Firma TopLab in München durchgeführt. Die Proben wurden entfärbt, gewaschen und mit Trypsin über Nacht verdaut. Anschließend wurden die Peptide aus der Gelmatrix eluiert und mit ZipTip ankonzentriert. Das Eluat wurde mit MALDI-TOF-MS vermessen. Hierbei wurde das Massenspektrometer 4800 *Proteomics Analyzer* (Applied Biosystems) eingesetzt.

Die sich anschließende Identifizierung erfolgte durch eine Datenbanksuche mit Mascot gegen das Genom von *D. shibae*. Die Datenbank wurde lokal von der Firma Top Lab angelegt. Als eindeutig identifiziert gelten Proteine mit einem p-Wert: $p < 0,05$.

3.7.7 Silberfärbung

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen nach der Gelelektrophorese erfolgte mittels Silberfärbung. Aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze dieser Methode war es möglich, sehr geringe Mengen Protein (zwischen 50 bis 100 pg) nachzuweisen. Dazu wurde das Polyacrylamidgel nach dem Lauf 0,5 -2 h in Fixierungslösung inkubiert. Darin enthaltene Essigsäure und Methanol denaturierten dabei die Proteine, so dass diese im Gel immobilisiert wurden. Ein Zusatz von Formaldehyd sorgte für eine zusätzliche Quervernetzung der Proteine über Methylenbrücken. Im Anschluss wurde das Gel zweimal für 20 min mit 50%igem (v/v) Ethanol gewaschen, gefolgt von einem kurzen Waschschrift mit MilliQ H_2O . Um eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde das Gel 1 min lang in Sensitizerlösung geschwenkt und zwei weitere Male für 20 s mit MilliQ H_2O gewaschen. Während der folgenden 20-minütigen Inkubation in Färbelösung lagerten sich Silberionen durch Komplexbildung mit Gly-, Asp- und Cys-Resten an die Proteine an, während überschüssige Silberionen durch anschließendes zweimaliges Waschen für 20 s mit MilliQ H_2O entfernt wurden. Die Inkubation in Entwicklerlösung betrug in der Regel

zwischen 3 und 10 min, wurde aber für jedes Gel individuell angepasst. In der Entwicklerlösung enthaltenes alkalisches Formaldehyd bewirkte hierbei die Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber, so dass die Proteine visualisiert wurden. Die Zugabe von Stopplösung für 30 s beendete die Reduktion der Silberionen sobald ein nach Ermessen des Durchführenden optimaler Färbezustand erreicht war. Nach kurzem Waschen des gefärbten Gels in MilliQ H₂O wurde es erneut für 30 min in Stopplösung geschwenkt bevor es bis zur Digitalisierung in MilliQ H₂O gelagert wurde.

Fixierungslösung	50,0	% (v/v)	Ethanol
	12,0	% (v/v)	Essigsäure
			in MilliQ H ₂ O

Zugabe von 500 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro l Fixierungslösung direkt vor Verwendung.

Sensitizerlösung	0,02	% (w/v)	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5 H ₂ O
			in MilliQ H ₂ O

Färbelösung	2,0	% (w/v)	AgNO ₃
			in MilliQ H ₂ O

Zugabe von 750 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro l Färbelösung direkt vor Verwendung. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss.

Entwicklerlösung	3,0	% (w/v)	Na ₂ CO ₃
	1,0	ml	Sensitizerlösung
			in MilliQ H ₂ O

Zugabe von 500 µl 37 % (v/v) Formaldehyd pro l Entwicklerlösung.

Stopplösung	5,0	% (w/v)	Glycin
			in MilliQ H ₂ O

Alle Lösungen wurden direkt vor Verwendung angesetzt. Für 1D-Polyacrylamidgele wurden 25 ml, für 2D-Gele 100 ml der jeweiligen Lösung verwendet.

3.8 Transmissions-Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur Herstellung von Kryoschnitten für Aufnahmen mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop wurden 5 ml einer *D. shibae* DFL12^T Kultur, welche etwa einem OD-Äquivalent von 2,5 entsprach verwendet. Die Kulturflüssigkeit wurde mit 1 mL 5%iger Formaldehyd und 400 µL 2%iger Glutaraldehyd-Lösung gemischt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5min bei 4 °C und 3.300 g sedimentiert. Das Sediment wurde in 1mL PBS-Lösung suspendiert und erneut 5 min bei 4°C und 6.000 g sedimentiert. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres mal wiederholt. Das gewonnene Sediment wurde in 1 mL 1%igerOsO₄-Lösung resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschrift mit PBS. Die fixierten, kontrastierten und gewaschenen Zellen wurden im Anschluss in 1 ml PBS suspendiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten durch Herrn PD Dr. Rhode am HZI Braunschweig.

PBS-Lösung	NaCl	8,0 g
	Kcl	0,2 g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	mit deion. H ₂ O auf 1 l auffüllen	
Fixierer	Formaldehyd	5 ml
	Glutaraldehyd	2 ml
	deion. H ₂ O	93 ml
Kontrastmittel (5 x)	OsO ₄	250 mg
	mit deion. H ₂ O auf 5 ml auffüllen	

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ein genetisches System für Bakterien des *Roseobacter*-Clusters – Rationale des gewählten Ansatzes

Um die physiologischen und ökologischen Eigenschaften von Bakterien des *Roseobacter*-Clusters zu untersuchen, war es im Vorfeld notwendig, geeignete mikrobiologische und molekularbiologische Techniken für diese Bakteriengruppe zu etablieren. Einfache und effiziente Methoden der Genmanipulation sind für systembiologische Analysen unerlässlich. So können nur über Regulatormutanten mittels DNA-Arrays und Proteomanalysen Regulons definiert werden. Ausgewählte Promotoren können dann über Reporterfusionen näher *in vivo* charakterisiert werden. All dies benötigt aber funktionierende genetische Werkzeuge. Genauso kann der Beitrag von Enzymsystemen zum Stoffwechsel über entsprechende Mutanten evaluiert werden. Für einige Mitglieder der Gattung *Rhodobacter*, wie *R. sphaeroides* und *R. capsulatus*, wurden derartige Methoden bereits beschrieben (Fornari und Kaplan, 1982; Pemberton *et al.*, 1983). Für Gattungen, die der *Roseobacter*-Gruppe angehören, sind solche Methoden bisher nur wenig beschrieben. Bisher wurden Methoden wie Elektroporation, Mating, Transposon-Mutagenese, Konstruktion einer Knock-out Mutante und biparentales Mating für die Arten *Phaeobacter* sp., *Ruegeria* sp. TM1040, *R. pomeroyi* und *Sulfitobacter* sp. J441 der *Roseobacter*-Gruppe beschrieben (Geng *et al.*, 2008; Miller und Belas, 2006; Howard *et al.*, 2006; Sebastian und Ammerman, 2009; Curson *et al.*, 2008). Von anderen Bakteriengruppen ist allerdings bekannt, dass Methoden, welche für eine Art entwickelt wurden, nicht zwingend in nah verwandten Arten angewendet werden können (Mercenier und Chassy, 1988; Schweizer, 2008). Daher wurden in dieser Arbeit Methoden entwickelt, welche es ermöglichen sollen, mit verschiedenen Arten der *Roseobacter*-Gruppe genetisch zu arbeiten.

Nachdem ein geeignetes Wachstumsmedium für nachfolgende Versuche bestimmt wurde, wurde ermittelt, gegen welche ausgewählten Antibiotika die untersuchten Stämme natürlicher Weise resistent sind, um so geeignete Konzentrationen für Selektionsmarker festzulegen. Mit diesen Kenntnissen konnten verschiedene Transformationsmethoden hinsichtlich ihrer Effizienz getestet werden. Eine der getesteten Transformationsmethoden diente letztlich dazu, ein auch unter anaeroben Bedingungen funktionelles

Reportergensystem für einige der untersuchten Stämme zu etablieren. Somit wurden mit nachfolgenden Versuchen die Grundlagen für genetische Arbeiten mit den hier verwendeten Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe geschaffen. Diese Arbeiten wurden in BMC Microbiology 2009, 9:265 von Piekarski *et al.* veröffentlicht.

4.1.1 Wachstumsverhalten von *Escherichia coli* ST18 und Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe bei verschiedenen Salzkonzentrationen

Zur Ermittlung eines geeigneten Mediums für nachfolgende Versuche, z.B. der Konjugation zum DNA-Transfer zwischen *E. coli* und Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe, wurde das Wachstumsverhalten von sechs Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe (*D. shibae* DFL-12^T, *Oceanibulbus indolifex* HEL-45^T, *P. gallaeciensis* 2.10, *P. inhibens* T5^T, *R. denitrificans* 7001^T und *R. litoralis* 6996^T) sowie des Stammes *E. coli* ST18 (Thoma und Schobert, 2009) in fünf verschiedenen Medien (Luria Bertani-Medium (LB), LB-Medium mit einem Zusatz von 0,85 % (w/v) Meersalz (LB+hs), LB-Medium mit einem Zusatz von 1,7 % (w/v) Meersalz (LB+s), halbkonzentriertes Marine Bouillon-Medium (hMB) und Marine Bouillon-Medium (MB)) unterschiedlicher Salzkonzentration untersucht. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 200 rpm. Tabelle 9 zeigt die ermittelten Wachstumsraten.

Tabelle 9: Ermittelte Wachstumsraten der Bakterienstämme in verschiedenen Medien. Die Kultivierung erfolgte in den Medien LB, LB+hs, LB+s, MB und hMB. Die Stämme der *Roseobacter*-Gruppe wurden bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. *E. coli* ST18 wurde bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Das jeweilige Medium enthielt einen Zusatz von 50 µg/ml ALA. n.b. = nicht bestimmbar.

Stamm Medium	Wachstumsrate µ [h ⁻¹]				
	LB	LB+hs	LB+s	MB	hMB
<i>D. shibae</i> DFL-12 ^T	n.b.	0,31	0,09	0,14	0,32
<i>O. indolifex</i> HEL-45 ^T	n.b.	0,29	0,26	0,43	0,50
<i>P. gallaeciensis</i> 2.10	0,01	0,50	0,37	0,70	0,62
<i>P. inhibens</i> T5 ^T	n.b.	0,37	0,50	0,80	0,48
<i>R. denitrificans</i> 7001 ^T	0,02	0,19	0,22	0,60	0,30
<i>R. litoralis</i> 6996 ^T	n.b.	0,13	0,27	0,20	0,28
<i>E. coli</i> ST18	1,01	1,04	0,09	0,08	0,70

In LB-Medium konnte kein Wachstum von den meisten der untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe beobachtet werden. Lediglich für die beiden *Phaeobacter*-Arten konnte eine sehr geringe Wachstumsrate bestimmt werden (Tab. 9).

LB-Medium enthält nur etwa 90 mM Na⁺-Ionen, eine Konzentration, die nicht für alle untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe ausreichend zu sein scheint. Marine Bakterien benötigen für ihr Wachstum erhöhte Konzentrationen an Na⁺-Ionen verglichen mit vielen terrestrischen Bakterien (MacLeod und Onofrey, 1956; Tyler *et al.*, 1960). Die hierbei erforderliche Konzentration variiert dabei zwischen den einzelnen marinen Mikroorganismen (Tyler *et al.*, 1960; MacLeod, 1965; Pratt, 1963). So beträgt die optimale Konzentration der Na⁺-Ionen für eine Vielzahl mariner Bakterien 200 – 300 mM. Es wurden jedoch bereits Stämme beschrieben, deren optimales Wachstum bei deutlich geringeren (5 mM; MacLeod, 1965) bzw. höheren Na⁺-Ionen Konzentrationen (2,0 M; Tyler *et al.*, 1960) erfolgt.

Durch den Zusatz von Meersalz wurde die Na⁺-Ionen Konzentration auf 210 mM (LB+hs) bzw. 320 mM (LB+s) erhöht, so dass sie in einem für viele marine Bakterien optimalen Bereich liegt (s.o.). Hier wuchsen, abhängig von dem individuellen Salzbedarf des einzelnen Bakteriums, einige Stämme besser in LB+hs, wohingegen andere Stämme der *Roseobacter*-Gruppe höhere Wachstumsraten in LB+s aufwiesen (Tab. 9).

Neben Na⁺-Ionen besitzt eine Vielzahl der marinen Bakterien einen Bedarf an K⁺-Ionen (MacLeod und Onofrey, 1956; Tyler *et al.*, 1960; Drapeau *et al.*, 1966). Außerdem werden divalente Ionen wie Ca²⁺, Fe²⁺ und Mg²⁺ für ein optimales Wachstum benötigt. Die Art und Konzentration der essentiellen Ionen ist dabei stark von der einzelnen Bakterienart (MacLeod und Onofrey, 1956; Tyler *et al.*, 1960; MacLeod, 1965) sowie der Kombination der Ionen untereinander abhängig.

So wurde für das Wachstum einiger mariner Bakterien ein Bedarf von Mg²⁺-Ionen zwischen 4 und 8 mM ermittelt, welcher aber durch die Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen auf geringere Konzentrationen gesenkt wurde (MacLeod und Onofrey, 1956). Es wurde beschrieben, dass divalente Ionen in ausreichenden Konzentrationen die Zelllyse verhindern können (MacLeod, 1965; Unemoto und Hayashi, 1977). Es wurde vermutet, dass sie hierbei mit der Zellhülle interagieren und dieser dadurch eine größere mechanische Stabilität vermitteln (Rayman und MacLeod, 1975).

In dem verwendeten LB-Medium fehlten größere Mengen K^+ -Ionen sowie divalenter Ionen, so dass dies eine mögliche Erklärung ist, warum kein optimales Wachstum stattfinden konnte. Dass Stämme mit einem essentiellen Bedarf an divalenten Ionen überhaupt in dem LB-Medium wachsen konnten, mag von dem Ioneneintrag von Bestandteilen wie Pepton und Hefeextrakt herrühren (MacLeod, 1965). Der Zusatz von Meersalz zu dem LB-Medium führte zu Konzentrationen von 2,5 mM K^+ -Ionen, 2,5 mM Ca^{2+} -Ionen und 7,5 mM Mg^{2+} -Ionen in dem LB+hs-Medium sowie 5 mM K^+ -Ionen, 5 mM Ca^{2+} -Ionen und 15 mM Mg^{2+} -Ionen in dem LB+s-Medium. Dieser Zusatz an essentiellen Ionen könnte neben der Erhöhung der Na^+ -Ionen Konzentration ebenfalls für einen positiven Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme der *Roseobacter*-Gruppe gehabt haben.

Die Kultivierung in MB bzw. hMB zeigte deutlich höhere Wachstumsraten, welche wiederum, je nach individuellem Salzbedarf der einzelnen Stämme, bei beiden Medien variierten (Tab. 9). Diese Medien enthielten neben einer optimalen Na^+ -Konzentration (370 mM bzw. 190 mM) weitere essentielle Ionen wie K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} in ausreichenden Konzentrationen (5 mM K^+ -Ionen, 10 mM Ca^{2+} -Ionen und 45 mM Mg^{2+} -Ionen in dem hMB-Medium sowie 10 mM K^+ -Ionen, 20 mM Ca^{2+} -Ionen und 90 mM Mg^{2+} -Ionen in dem LB+hs-Medium).

Der *E. coli* Stamm ST18 zeigte ein genau gegensätzliches Verhalten. Während sein Wachstum in LB-Medium sehr gut war und eine Wachstumsrate von $1,01\ h^{-1}$ erreichte, war das Wachstum in LB-Medium mit einem Zusatz von 0,85 % (w/v) Meersalz bereits etwas verschlechtert. Zwar entsprach die hierbei ermittelte Wachstumsrate der in LB-Medium, jedoch war die maximal erreichte optische Dichte geringer ($OD_{578nm} = 4,5$ in LB und 2,8 in LB+hs, innerhalb von 8 h). In hMB war die ermittelte Wachstumsrate mit $0,70\ h^{-1}$ bereits deutlich geringer. Auch die maximal erreichte optische Dichte war wesentlich geringer als in LB-Medium ($OD_{578nm} = 4,0$ in LB und 0,9 in hMB, innerhalb von 8 h). Die für *E. coli* beschriebene optimale Na^+ -Konzentration beträgt ca. 200 mM (Brown und Turner, 1963). Sowohl in LB+hs als auch in hMB entspricht die vorliegende Na^+ -Ionenkonzentration etwa diesem Optimum (210 mM in LB+hs bzw. 185 mM in hMB). Eine mögliche Erklärung für ein dennoch verschlechtertes Wachstum gegenüber dem in LB wäre der zusätzliche Eintrag von Ionen wie K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} . So verschlechterte sich das Wachstum bereits bei

geringen zusätzlichen Mengen dieser Ionen in LB+hs (2,5 mM K^+ -Ionen, 2,5 mM Ca^{2+} -Ionen und 7,5 mM Mg^{2+} -Ionen) und wurde deutlich schlechter bei höheren Konzentration dieser Ionen in hMB (5 mM K^+ -Ionen, 10 mM Ca^{2+} -Ionen und 45 mM Mg^{2+} -Ionen). Bei Medien mit hohen Salzkonzentrationen (MB und LB+s) war lediglich ein schwaches oder kein Wachstum mehr detektierbar (Tab. 9).

Für nachfolgende Konjugationsversuche wurde ein Medium benötigt, in dem sowohl die jeweiligen Rezipienten-Stämme der *Roseobacter*-Gruppe als auch der Donor *E. coli* ST18 Stamm ausreichend gut wachsen können. Dies trifft den Ergebnissen nach auf die Medien LB+s sowie hMB zu. Aufgrund des etwas besseren Wachstums der Stämme der *Roseobacter*-Gruppe in hMB wurde dieses Medium für nachfolgenden Konjugationsversuche als Kulturmedium verwendet.

4.1.2 Bestimmung der natürlichen Antibiotika-Resistenzen verschiedener Stämme der *Roseobacter*-Gruppe

Um molekularbiologische Arbeiten mit den untersuchten Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe durchführen zu können, ist es notwendig, deren natürliche Resistenzen gegen Antibiotika zu kennen. So können Bakterien mit Plasmid-DNA transformiert werden, welche anschließend mit Hilfe eines plasmidkodierten Antibiotika-Resistenzgenes als Selektionsmarker in den Zellen nachgewiesen wird. Zur Bestimmung der natürlichen Antibiotika-Resistenzen der untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe wurden acht molekularbiologisch häufig verwendete Antibiotika gewählt. Diese gehören verschiedenen chemischen Gruppen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen an. Getestet wurden die Aminoglycosid-Antibiotika Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin und Spectinomycin, die beiden β -Lactam-Antibiotika Ampicillin und Carbenicillin sowie Tetracyclin und Chloramphenicol. Es ist beschrieben, dass hohe Konzentrationen divalenter Ionen die Aktivität einiger Antibiotika herabsetzen können. So senkt die Zugabe von Ca^{2+} -oder Mg^{2+} -Ionen die Aktivität von Gentamycin, Tetracyclin und Carbenicillin und somit ihre Wirksamkeit gegen verschiedene *Pseudomonas* Arten. Eine Kombination beider Ionen verstärkt diesen Effekt (D'amato *et al.*, 1975). Um eine mögliche Inaktivierung der Antibiotika zu vermeiden, erfolgte die Bestimmung der natürlichen Resistenzen in hMB-Medium. So war ein ausreichend gutes Wachstum bei gleichzeitig verringerter

Ionenkonzentration gewährleistet (siehe 4.1.1).

4.1.2.1 Untersuchung der Antibiotika-Stabilitäten

Für Tetracyclin wurde beschrieben, dass sowohl der pH-Wert als auch die Temperatur einer wässrigen Tetracyclinlösung einen Einfluss auf die Degradationsgeschwindigkeit besitzen. Diese erhöht sich mit steigender Temperatur und steigendem pH-Wert (Loftin *et al.*, 2008). Auch für wässrige Ampicillinlösungen wurde eine rasche Degradation in Abhängigkeit der Konzentration, der Temperatur und des pH-Wertes nachgewiesen (Hou und Poole, 1969; Schwartz und Hayton, 1972; Allwood und Brown, 1993). Da die Bestimmung der natürlichen Resistenzen von Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe für fünf Tage im Dunkeln bei 30 °C erfolgen sollte, wurde im Vorfeld sicher gestellt, dass die untersuchten Antibiotika während dieser Inkubation keinen Aktivitätsverlust erlitten. Dazu wurde ihre Stabilität bei 30 °C über 5 Tage im Dunkeln untersucht. Als Kriterium wurde die Hemmwirkung des Antibiotikums vor und nach fünftägiger Inkubation in hMB bei 30 °C auf *E. coli* DH5 α herangezogen. In Tab. 10 sind die Ergebnisse des Stabilitätstestes angegeben. Vor und nach Inkubation bei 30 °C war kein Unterschied in der Hemmwirkung der getesteten Antibiotika erkennbar. Demnach hat die mehrtägige Inkubation bei 30 °C keinen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Antibiotika.

Tabelle 10: Antibiotika-Stabilitäten bei 30 °C. Untersucht wurde die Hemmwirkung der untersuchten Antibiotika auf das Wachstum von *E. coli* DH5 α vor und nach fünftägiger Inkubation in antibiotikumhaltigen hMB-Medium bei 30 °C. (+) = Hemmung des Wachstums, (-) keine Hemmung des Wachstums.

Antibiotikum	Inkubation [d]	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]		
		50	100	500
Ampicillin	0	-	+	+
	5	-	+	+
Carbenicillin	0	+	+	+
	5	+	+	+
Chloramphenicol	0	+	+	+
	5	+	+	+
Gentamycin	0	+	+	+
	5	+	+	+
Kanamycin	0	+	+	+
	5	+	+	+
Spectinomycin	0	+	+	+
	5	+	+	+
Streptomycin	0	+	+	+
	5	+	+	+
Tetracyclin	0	+	+	+
	5	+	+	+

4.1.2.2 Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC)

Die MIC der sechs untersuchten Stämme *D. shibae* DFL-12^T, *O. indolifex* HEL-45^T, *P. gallaeciensis* 2.10, *P. inhibens* T5^T, *R. denitrificans* 7001^T und *R. litoralis* 6996^T wurde für die auf ihre Stabilität getesteten Antibiotika (Tab. 10) bestimmt. Zusätzlich wurde geprüft, ob zwischen dem Stamm *D. shibae* DFL-12^T und sechs weiteren Isolaten dieser Art stammspezifische Unterschiede bezüglich ihrer Antibiotika-Resistenzen existieren. Solche stammspezifischen Resistenzdivergenzen wurden bereits für verschiedene Arten wie u.a. *Bacteroides fragilis*, *Nocardia asteroides* und verschiedene *Streptococcus*-Arten beschrieben (Jenkins *et al.*, 1982; Wallace *et al.*, 1988; Tracy *et al.*, 2001). Bei den hier durchgeführten Bestimmungen wurde ein Stamm als resistent gegen ein Antibiotikum bezeichnet, wenn seine MIC für das entsprechende Antibiotikum >100 $\mu\text{g/ml}$ war. Tabelle 11 zeigt die ermittelten MIC.

Tabelle 11: Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) der untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe. Die Stämme wurden in hMB Medium mit verschiedenen Konzentrationen der getesteten Antibiotika für fünf Tage bei 30 °C statisch inkubiert. Nach drei und fünf Tagen wurde der Bewuchs des Mediums kontrolliert. Die MIC wurde hierbei als „die geringste Konzentration eines Antibiotikums, die das Wachstum des Bakterienstammes inhibierte“ definiert. Amp = Ampicillin, Car = Carbenicillin, Chl = Chloramphenicol, Gen = Gentamycin, Kan = Kanamycin, Spt = Spectinomycin, Str = Streptomycin, Tet = Tetracyclin.

Antibiotikum	Amp	Car	Chl	Gen	Kan	Spt	Str	Tet
Stamm	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
<i>D. shibae</i> DFL-12 ^T	>100	>100	15	20	>100	20	25	40
<i>D. shibae</i> DFL-16	>100	>100	15	35	100	10	30	30
<i>D. shibae</i> DFL-27	>100	>100	10	20	>100	15	40	20
<i>D. shibae</i> DFL-30	>100	>100	10	20	>100	15	30	30
<i>D. shibae</i> DFL-31	>100	>100	15	20	>100	10	35	35
<i>D. shibae</i> DFL-36	>100	>100	10	20	>100	15	25	30
<i>D. shibae</i> DFL-38	>100	>100	15	20	>100	10	35	25
<i>O. indolifex</i> HEL-45 ^T	30	20	10	10	20	10	10	30
<i>P. gallaeciensis</i> 2.10	>100	40	10	30	50	5	20	30
<i>P. inhibens</i> T5 ^T	90	20	15	5	80	5	20	10
<i>R. denitrificans</i> 7001 ^T	>100	<2	30	>100	>100	>100	>100	50
<i>R. litoralis</i> 6996 ^T	>100	<2	10	20	40	10	5	35

Beinahe alle hier untersuchten Stämme zeigten mit einer MIC >100 µg/ml eine Resistenz gegenüber Ampicillin. Dieses Ergebnis wird von durch Datenbankabgleich erhaltenen Resultaten bestätigt. Überprüft wurden hierbei die sequenzierten Genome der Stämme *D. shibae* DFL-12^T, *O. indolifex* HEL-45^T, *P. gallaeciensis* 2.10, *R. denitrificans* 7001^T und

R. litoralis 6996^T. Demnach besitzen alle sequenzierten Genome der hier genutzten Stämme zehn oder mehr für β -Lactamasen kodierende Gene. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der Abbau von β -Lactam-Antibiotika eine intrinsische Resistenz von *Roseobacter*-Bakterien ist. Neben Ampicillin zeigten alle *D. shibae*-Stämme außerdem eine Resistenz gegenüber dem β -Lactam-Antibiotikum Carbenicillin, welche die anderen untersuchten *Roseobacter*-Stämme nicht aufwiesen. Im Gegenteil dazu waren die beiden Stämme *R. denitrificans* 7001^T und *R. litoralis* 6996^T ausgesprochen sensitiv gegenüber diesem Antibiotikum.

Gegen die Antibiotika Tetracyclin und Chloramphenicol zeigte keiner der untersuchten Stämme eine natürliche Resistenz. Zwar wurden mit Hilfe der Datenbank IMG (Markowitz und Kyrpides, 2007) für die Stämme *D. shibae* DFL-12^T, *O. indolifex* HEL-45^T, *R. denitrificans* 7001^T und *R. litoralis* 6996^T putative Tetracyclin-Resistenzgene gefunden, jedoch ist die automatische Annotation dieser Gene noch nicht experimentell bestätigt. So könnten die Gene anstelle für Tetracyclin-Efflux Proteine auch für einen anderen der *Major Facilitator* Superfamilie zugehörigen Transporter kodieren. Mitglieder dieser Gruppe von Membranproteinen unterscheiden sich in ihrer Substratbindestelle teilweise nur um wenige Aminosäuren voneinander. Jedoch sind diese geringen Varianzen ausschlaggebend für eine stringente Spezifität (Law *et al.*, 2008). Die Suszeptibilität gegenüber Chloramphenicol von *D. shibae*, *P. gallaeciensis* und *P. inhibens* wurde bereits in ihren Stammbeschreibungen geschildert (Biebl *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2006). Demnach handelt es sich bei der für *P. gallaeciensis* 2.10 annotierten putativen Chloramphenicol-Acetyltransferase möglicherweise um eine andere Art von Transferase.

Alle untersuchten *D. shibae* Stämme zeigten eine Resistenz gegen Kanamycin, jedoch nicht gegen die anderen getesteten Aminoglycosid-Antibiotika. Mit Hilfe von IMG wurden für das Genom von *D. shibae* DFL-12^T fünf putative Aminoglycosid-Phosphotransferasen identifiziert, welche die Kanamycin-Resistenz der *D. shibae* Stämme erklären könnten.

Auch *R. denitrificans* 7001^T zeigte sich gegenüber Kanamycin resistent, darüber hinaus aber auch gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Gentamycin, Spectinomycin und Streptomycin. Die Gentamycin-Resistenz wurde für *R. denitrificans* 7001^T bereits beschrieben (Shiba, 1991). Durch die Genomanalyse des Stammes mittels IMG konnten jeweils eine putative Aminoglycosid-Acetyltransferase sowie eine putative Aminoglycosid-

Phosphotransferase identifiziert werden, welche die Inaktivierung der Aminoglycoside durch Modifikation bewirken könnten.

Die anderen untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe zeigten keine Resistenz gegenüber Aminoglycosiden. Allerdings wurden die beiden *Phaeobacter*-Stämme bei höheren Kanamycinkonzentrationen (*P. gallaeciensis*: 50 µg/ml, *P. inhibens*: 80 µg/ml) in ihrem Wachstum inhibiert. Eine Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin wurde für beide *Phaeobacter*-Arten bereits beschrieben (Martens *et al.*, 2006).

Der Vergleich einzelner *D. shibae*-Stämme untereinander zeigte, dass scheinbar eine intrinsische Resistenz gegenüber Ampicillin, Carbenicillin und Kanamycin vorliegt. Gegenüber den anderen getesteten Antibiotika zeigten sie eine Sensitivität. Hierbei unterschieden sich die MIC für die einzelnen *D. shibae*-Stämme nur geringfügig voneinander.

Zusammenfassend konnten aus den MIC-Bestimmungen für jeden untersuchten *Roseobacter*-Stamm mindestens drei verschiedene Antibiotika ermittelt werden, die für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen als Selektionsmarker genutzt werden können. Für nachfolgende Experimente wurde dem Medium zur Selektion die zweifache MIC des jeweiligen Antibiotikums zugegeben.

Die MIC eines Antibiotikums kann sich in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen ändern. So kann sie sich für eine Bakterienart unterscheiden, je nachdem ob statisch oder geschüttelt inkubiert wird. Auch für die Kultivierung auf Agarplatten kann bei gleichem Medium die MIC abweichen (Hashemi *et al.*, 1996; Sepandj *et al.*, 2007). Um sicherzustellen, dass die zweifache MIC für Selektionszwecke auch in geschüttelten Kulturen bzw. für die Kultivierung auf Agarplatten ausreichend ist, wurde sie ebenfalls für diese Kultivierungsbedingungen getestet. Es zeigte sich, dass die gewählte zweifache MIC für alle Kultivierungsbedingungen ausreichend war, um das Wachstum der jeweiligen Bakterienart zu hemmen (Piekarski *et al.*, 2009). Demnach können die ermittelten MICs unter allen Wachstumsbedingungen zur Selektion bei molekularbiologischen Arbeiten verwendet werden.

4.1.3 Transformation von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe

Für die genetische Untersuchung von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe bestand die Notwendigkeit, eine geeignete Methode zur Transformation der Zellen mit DNA zu etablieren. Eine hohe Transformationsrate war hierbei wünschenswert. Da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass herkömmliche Transformationsprotokolle (wie für z.B. *E. coli*) für die strikt salzbedürftigen Stämme der *Roseobacter*-Gruppe in gleichem Maße funktionieren, wurden bekannte Methoden zur Transformation getestet, gegebenenfalls variiert und die Transformationsrate bestimmt. Hierbei wurden die Stämme der *Roseobacter*-Gruppe in Abhängigkeit von ihrer Antibiotikaresistenz mit verschiedenen Derivaten des Broad-Host Vektors pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1995) transformiert.

4.1.3.1 Transformation chemokompetenter Zellen von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe

Chemokompetente Zellen wurden hergestellt, indem Stämme der *Roseobacter*-Gruppe mit CaCl_2 - bzw. RbCl_2 -Lösung behandelt wurden. Anschließend wurden die kompetenten Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA entsprechend der Standardmethode für *E. coli* (Sambrook und Russell, 2001) transformiert. Weder die Transformation CaCl_2 - noch RbCl_2 -kompetenter Zellen von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe resultierte in Transformanten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen, die bei der Transformation chemokompetenter Zellen von Stämmen der Gattung *Rhodobacter* erhalten wurden (Hilton *et al.*, 1999). *Rhodobacter* sind phylogenetisch nahe verwandt mit den Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe, so dass ein ähnliches Verhalten bei der Transformation möglich ist. Bisher wurde erst ein erfolgreicher Versuch beschrieben, CaCl_2 -kompetente *Rhodobacter sphaeroides*-Zellen zu transformieren (Fornari und Kaplan, 1982). Aber auch die initialen Versuche, die hier untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe nach dieser Methode zu transformieren, schlugen fehl.

4.1.3.2 Transformation elektrokompenter Zellen von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe

In der Vergangenheit wurden bereits erfolgreich Transformationen von elektrokompenten *R. sp.* TM1040- und *R. pomeroyi*-Zellen durchgeführt (Miller und Belas, 2006; Geng *et al.*, 2008; Sebastian und Ammerman, 2009). Entsprechend der Methode von Miller und Belas wurden in dieser Arbeit salzfreie Suspensionen der verschiedenen Stämme durch das Waschen mit 10 %iger (v/v) Glycerinlösung hergestellt. Die erforderliche Anzahl an

Waschschritten zur Entfernung aller Salze wurde ermittelt, indem deren Anzahl sukzessive gesteigert wurde. Mindestens fünf Waschschritte waren nötig, um die Suspension für die Elektroporation effektiv von allen störenden Salzen zu befreien. Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch die bei der Elektroporation erhaltene, optimale Pulslänge von 4,9-5,0 ms. Für die Elektroporation wurden 25 und 50 ng DNA des Vektors pBBR1MCS eingesetzt. Jedoch resultierten beide DNA-Mengen in gleichen Transformationsraten. Die Pulsintensitäten wurden zwischen 1,5 und 3,0 kV variiert. Hierbei wurde eine Pulsintensität von 2,5 kV als die geeignetste ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die getestete Transformationsmethode war für alle untersuchten Stämme erfolgreich. Allerdings variierte die Transformationsrate zwischen den einzelnen Arten von $1 \cdot 10^3$ bis $1 \cdot 10^7$ Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro eingesetztem μg Plasmid-DNA sehr stark. Tabelle 12 zeigt die ermittelten Transformationsraten.

Tabelle 12: Ermittelte Transformationsraten für die Elektroporation der untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe. Die Stämme wurden mit 25 und 50 ng Plasmid-DNA transformiert. Die Transformation erfolgte bei einer Pulsintensität von 2,5 kV, einer Pulslänge von 4,9 - 5,0 ms, einer Kapazität von 25 μF und einem Widerstand von 200 Ω .

Stamm	Transformationsrate [KbE/ μg Plamid-DNA]
<i>D. shibae</i> DFL-12 ^T	$1 \cdot 10^4$
<i>O. indolifex</i> HEL-45 ^T	$1 \cdot 10^7$
<i>P. gallaeciensis</i> 2.10	$1 \cdot 10^5$
<i>P. inhibens</i> T5 ^T	$1 \cdot 10^3$
<i>R. denitrificans</i> 7001 ^T	$1 \cdot 10^4$
<i>R. litoralis</i> 6996 ^T	$1 \cdot 10^3$

P. inhibens und *R. litoralis* zeigten mit $1 \cdot 10^3$ cfu/ μg Plamid-DNA nur sehr geringe Transformationsraten. Etwas höher waren die Effizienzen für *D. shibae* und *R. denitrificans* mit $1 \cdot 10^4$ cfu/ μg Plamid-DNA. Die Transformationsrate für *P. gallaeciensis* war demgegenüber mit $1 \cdot 10^5$ cfu/ μg Plamid-DNA noch einmal erhöht. Für *O. indolifex* wurden Transformationseffizienzen von bis zu $1 \cdot 10^7$ cfu/ μg erreicht.

Insgesamt sind die hier erlangten Transformationseffizienzen für die Verwendung bei genetischen Arbeiten relativ gering. In der Literatur sind für einige *E. coli*-Stämme Transformationseffizienzen von 10^9 - 10^{10} cfu/ μg Plamid-DNA beschrieben (Dower *et al.*,

1988). Für eine Vielzahl Gram-negativer Bakterien wurden jedoch wesentlich geringere Transformationseffizienzen ermittelt. So wurde für *Campylobacter jejuni* eine Transformationsrate von $1,2 \cdot 10^6$ cfu/ μ g Plamid-DNA bestimmt (Miller *et al.*, 1988). Für die Arten *Enterobacter aerogenes* und *Proteus mirabilis* beträgt die Effizienz lediglich $5 \cdot 10^1$ bzw. $6 \cdot 10^3$ cfu/ μ g Plasmid-DNA. Andere Gram-negative Arten wie *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella oxytoca* und *Hafnia alvei* wurden sogar als nicht-transformierbar beschrieben. Allerdings wurde hierbei angemerkt, dass die getesteten Bedingungen unter Umständen nicht für die Stämme geeignet waren (Wirth *et al.*, 1989).

Zwar stellt die Elektroporation eine leistungsstarke Transformationsmethode dar, jedoch sind die damit erhaltenen Effizienzen maßgeblich abhängig von der elektrischen Spannung und der Länge des elektrischen Pulses (Miller *et al.*, 1988; Dower *et al.*, 1988). Diese Faktoren wiederum werden von der Konsistenz der Bakterienart beeinflusst. So wurde die Elektroporation von *C. jejuni* mit stark erhöhter Spannung (5-13 kV/cm) als effiziente Methode beschrieben (Miller *et al.*, 1988). Auch für *Acidithiobacillus caldus* wurden optimale Spannungen und Pulslängen ermittelt, die weit über denen bisher für andere Gram-negative Organismen beschriebenen liegen (Chen *et al.*, 2009).

Für die Stämme der *Roseobacter*-Gruppe könnte eine weitere Optimierung im Bereich höherer Spannung ebenfalls zu einer Steigerung der Transformationsrate führen. Die Pulslängen wurde in dieser Arbeit bereits variiert und zeigten keinerlei Einfluss. Eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Transformationseffizienz könnte die Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) bieten. Diese umgeben die Zellwand und stellen für die Plasmid-DNA eine Barriere beim Eintritt in die Zelle dar. Eine Erhöhung der DNA-Konzentration, um die Wahrscheinlichkeit des Eintritts der DNA in die Zelle zu erhöhen, führt jedoch zu einer höheren Konduktivität der Lösung. Dies bewirkt, dass sich die Anzahl toter Zellen erhöht und sich folglich negativ auf die Transformationseffizienz auswirkt (Chen *et al.*, 2009).

Für Mitglieder der *Roseobacter*-Gruppe ist bekannt, dass eine Vielzahl der Arten Biofilme bildet, was mit der Produktion extrazellulärer Substanzen einhergehen könnte (Miller und Belas, 2006). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Stammes *D. shibae* DFL-12^T weisen auf die Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen hin (Biebl *et al.*, 2005). Zudem wurde in der Annotation ein Gencluster identifiziert, welches für ein

extrazelluläres, Alginat-ähnliches Polysaccharid kodiert. Es ist also möglich, dass die relativ niedrigen Transformationseffizienzen einiger Stämme der *Roseobacter*-Gruppe durch die Bildung von EPS bedingt sind.

Die in dieser Arbeit ermittelten Transformationseffizienzen sind relativ gering im Vergleich zu denen etablierter Transformationsstämmen wie z.B. *E. coli*. Jedoch sind sie ausreichend, um sie für genetische Arbeiten einzusetzen (Fiedler und Wirth, 1988). Von Nachteil bei dieser Methode ist die kurze Lagerungsfähigkeit der elektrokompenten Zellen bei -80 °C. Die Transformation aliquotierter elektrokompenter Zellen von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe, welche über verschieden lange Zeiträume bei -80 °C gelagert wurden, zeigten, dass die Transformationseffizienz mit der Lagerungsdauer abnahm. Die elektrokompenten Zellen ließen sich maximal drei Wochen lagern, im Falle von *R. denitrificans* betrug die mögliche Lagerungsdauer sogar nur eine Woche (Daten nicht gezeigt).

4.1.3.3 Transformation von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe mittels Konjugation

Konjugation ist unter Bakterien der am weitesten verbreitete Mechanismus horizontalen Gentransfers (de la Cruz und Davies, 2000). Auch wenn die Transformation von Bakterien mittels Elektroporation die effizientere Methode darstellt, so ist das Spektrum transformierbarer Bakterienarten bei der Konjugation wesentlich breiter. Die Konjugation wurde sowohl für Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien beschrieben. Für die Gattung *Rhodobacter* beschrieb Marrs 1974 erstmals den DNA-Transfer via Konjugation, mittlerweile existiert eine Vielzahl von Protokollen zur Transformation verschiedener Arten dieser Gattung (Marrs, 1974; Sistrom, 1977; Miller und Kaplan, 1978; Lang und Oesterheld, 1989; Fornari und Kaplan, 1982). Die für die *Rhodobacter* Arten beschriebenen Protokolle variieren sehr stark, insbesondere in Bezug auf die Dauer des Konjugationsschrittes und das Verhältnis von Donorzellen zu Rezipientenzellen. So wurde für die Konjugation von *Rhodobacter viridis* mit *Rhizobium meliloti* eine minimale Konjugationsdauer von 30 h ermittelt, während hingegen das Verhältnis der Donor-Rezipient Konzentration hierbei keinerlei Einfluss auf die Konjugationseffizienz hatte (Lang und Oesterheld, 1989). Dem gegenüber steht ein Protokoll für die Transformation von *R. sphaeroides* CU616 mit *R. sphaeroides* CU604. Die optimale Konjugationsdauer beträgt lediglich 9 h, jedoch wirken sich höhere Donor-Rezipient Konzentrationen (10:1) negativ auf die Konjugationseffizienz aus (Lang und Oesterheld, 1989). Neben diesen beiden gibt

es noch weitere Faktoren, die die Transformationsrate beeinflussen. So hat neben der Zusammensetzung des Wachstumsmediums auch dessen Beschaffenheit einen Effekt. Die Konjugation auf festen Oberflächen resultiert in höheren Transformationsraten als die in Flüssigmedium (Miller und Kaplan, 1978; Mazodier und Davies, 1991), da hier der erforderliche Zell-Zell-Kontakt wahrscheinlich eher gegeben ist (Lorenz und Wackernagel, 1994).

Für die Bestimmung der Konjugationseffizienz der sechs Stämme der *Roseobacter*-Gruppe wurden einige der oben aufgeführten Faktoren variiert. Entsprechend der Ergebnisse aus Kapitel 4.1.1 boten sich mit hMB und LB+hs lediglich zwei Konjugationsmedien an, welche die Bedingungen für ein ausreichendes Wachstum des Donorstammes *E. coli* ST18 und der Rezipientenstämme der *Roseobacter*-Gruppe erfüllten (Thoma und Schobert, 2009). Beide Medien wurden mit einem Zusatz von Aminolävulinsäure (ALA) versehen, um die ALA-Auxotrophie des Donorstammes zu kompensieren. Für die Konjugation wurde eine *E. coli* ST18 Donorkultur bis zum Erreichen der logarithmischen Phase kultiviert, in verschiedenen Verhältnissen von Donorzellen zu Rezipientenzellen (1:1; 2:1; 5:1; 10:1) mit den Rezipientenstämmen gemischt und auf das entsprechende Konjugationsmedium aufgebracht. Nach der Konjugation wurde aus dem Verhältnis Konjuganten zu Gesamtzellzahl die Konjugationseffizienz bestimmt (3.6.7).

Die Durchführung der Konjugation auf hMB-Agar führte hierbei zu deutlich höheren Konjugationseffizienzen als die Konjugation auf LB+hs (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden die besten Konjugationseffizienzen mit den Verhältnissen 5:1 und 10:1 erhalten, wobei sich diese untereinander nicht unterschieden (Daten nicht gezeigt). Die Dauer der Konjugation wurde ebenfalls variiert. Unter Berücksichtigung der geringen Wachstumsraten der Rezipientenstämme (vgl. Tabelle 9) wurden Konjugationszeiten von 24 h und 48 h getestet. Die ermittelten Effizienzen unterschieden sich hierbei nicht (Daten nicht gezeigt). Demnach ist eine 24-stündige Konjugation bei 30 °C für die Rezipientenstämme ausreichend. Die Konjugationseffizienz wurde ermittelt, indem das Verhältnis von Konjuganten zur Gesamtzellzahl bestimmt wurde. In Tabelle 13 sind die ermittelten Effizienzen der 24-stündigen Konjugation mit einem Donor-Rezipienten Verhältnis von 10:1 dargestellt.

Tabelle 13: Ermittelte Konjugationseffizienzen für das Plasmid pBBR1MCS. Rezipientenstämme der *Roseobacter*-Gruppe wurden 18 h in MB-Medium bei 30 °C kultiviert und anschließend mit *E. coli* ST18 Donorkulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, vermischt. Das Verhältnis Donor-Rezipient betrug 10:1. Das Mating erfolgte 24 h auf hMB-Agarplatten mit einem Zusatz von 50 µg/ml ALA bei 30 °C. Anschließend wurden die Zellen von der Agarplatte gekratzt, in MB-Medium suspendiert, eine serielle Verdünnung mit 1,7 %iger (w/v) Meersalzlösung hergestellt und die Verdünnungsstufen auf Antibiotika-haltigen und Antibiotika-freien hMB-Agarplatten ausplattiert. Nach fünftägiger Inkubation bei 30 °C wurde die Konjugationseffizienz aus dem Verhältnis Konjuganten:Gesamtzellzahl bestimmt.

Stamm	Konjuganten/ Gesamtzellzahl	Konjuganten/ml
<i>D. shibae</i> DFL-12 ^T	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^6$
<i>O. indolifex</i> HEL-45 ^T	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^5$
<i>P. gallaeciensis</i> 2.10	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^3$
<i>P. inhibens</i> T5 ^T	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^5$
<i>R. denitrificans</i> 7001 ^T	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^3$
<i>R. litoralis</i> 6996 ^T	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^3$

Die Konjugation mit dem Vektor pBBR1MCS führte bei allen eingesetzten Rezipientenstämmen zu Konjuganten. Bei dem Vergleich der Effizienzen untereinander zeigten sich jedoch teils große Unterschiede. So wurden sowohl für die beiden *Phaeobacter*-Arten als auch für *R. denitrificans* und *R. litoralis* Effizienzen von $1,0 \cdot 10^{-6}$ bis $5,0 \cdot 10^{-4}$ ermittelt. Diese erscheinen relativ gering, verglichen mit denen von *D. shibae* und *O. indolifex*, welche für beide Stämme ca. um den Faktor 100 bis 10.000 höher waren ($2,4 \cdot 10^{-2}$ und $2,7 \cdot 10^{-2}$). Betrachtet man jedoch die Zahl der Konjuganten pro Milliliter Bakteriensuspension, so beträgt die bei diesen Versuchen geringste Menge Konjuganten $1,0 \cdot 10^3$, die höchste Menge $2,0 \cdot 10^6$ Konjuganten. Aus diesen Werten wird ersichtlich, dass trotz der teils gering erscheinenden Transformanteneffizienzen ausreichend Konjuganten vorliegen, um diese Methode für genetische Arbeiten zu nutzen.

4.1.3.4 Plasmidstabilität

Die homologe Genexpression unter Verwendung des Vektors pRK415 in Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe wurde bislang lediglich in einer Publikation beschrieben (Howard *et al.*, 2006). Dieser *Broad Host Range* Vektor wurde schon häufig für Gram-negative Bakterien eingesetzt, unter anderem für *R. sphaeroides* (Keen *et al.*, 1988; Schneider *et al.*, 1993). Die wenigen Restriktionsschnittstellen in diesem Vektor sowie das darauf lokalisierte Tetracyclin-Resistenzgen können sich bei seiner Verwendung für genetische Arbeiten jedoch als nachteilig erweisen, da mit steigender Anzahl an Restriktionsschnittstellen die

Wahrscheinlichkeit der Kompatibilität mit dem zu inserierenden DNA-Fragment steigt. Außerdem ist das Vorhandensein von zwei oder mehr Antibiotikaresistenzgenen von Vorteil, da dadurch die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass der zu transformierende Organismus eine natürliche Resistenz gegen alle auf dem Plasmid organisierten Selektionsmarker besitzt. Aus diesem Grund wurden die untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe mit verschiedenen mobilisierbaren Plasmiden transformiert. Diese Plasmide gehören unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen (IncP und IncQ) an und tragen verschiedene Antibiotika-Resistenzgene. Desweiteren unterscheiden sie sich in ihrer Größe (Kap. 3.3). Die Stabilität der Plasmide in den transformierten Stämmen wurde überprüft, indem die Stämme unter nicht-selektiven Bedingungen über zehn Passagen in MB-Medium kultiviert wurden. Die Kulturen wurden vor jeder neuen Passage auf selektiven und nicht-selektiven hMB-Agarplatten ausgestrichen. Des Weiteren wurde von jeder Passage mittels Plasmidpräparation und Visualisierung durch Agarose-Gelelektrophorese das Vorhandensein des jeweiligen Plasmids in den Stämmen kontrolliert. Tabelle 14 zeigt die ermittelten Plasmidstabilitäten.

Tabelle 14: Stabilität verschiedener Plasmide unterschiedlicher Inkompatibilitätsgruppen in transformierten Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe. Die Stämme wurden mittels Konjugation mit den Plasmiden transformiert. Die Stabilität der Plasmide in den Stämmen wurde anschließend durch die Kultivierung unter nicht-selektiven Bedingungen in hMB-Medium über 10 Passagen kontrolliert. T= Transferierbarkeit der Plasmide (ja/nein); P= Anzahl der Passagen über welche die Plasmide stabil in den Zellen verblieben; n.b. = nicht bestimmbar.

Stamm	Plasmide											
	pBBR1MCS5		pRSF1010		pMMB67EH		pUCP20T		pLAFR3		pFLP2	
	T	P	T	P	T	P	T	P	T	P	T	P
<i>D. shibae</i> DFL12 ^T	ja	10	ja	10	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	nein	n.b.	n.b.	n.b.
<i>O. indolifex</i> HEL-45 ^T	ja	10	ja	10	ja	0	ja	0	ja	5	nein	n.b.
<i>P. gallaeciensis</i> 2.10	ja	10	nein	n.b.	nein	n.b.	nein	n.b.	nein	n.b.	nein	n.b.
<i>P. inhibens</i> T5 ^T	ja	10	nein	n.b.	nein	n.b.	nein	n.b.	nein	n.b.	nein	n.b.
<i>R. denitrificans</i> 7001 ^T	ja	10	ja	10	ja	0	ja	0	ja	0	nein	n.b.
<i>R. litoralis</i> 6996 ^T	ja	10	ja	10	ja	0	ja	0	nein	n.b.	ja	0

Plasmide, die der IncQ-Gruppe angehörten (pBBR1MCS5, pRSF1010 und pMMB67EH), konnten sich in den meisten Fällen stabil in den transformierten Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe etablieren (Tab. 14). Das Plasmid pBBR1MCS5 war in alle getesteten Stämme transferierbar und blieb dort auch ohne Selektionsdruck über mindestens 10 Passagen stabil erhalten. Mit dem Plasmid pRSF1010 konnten bis auf die *Phaeobacter*-Stämme alle Stämme transformiert werden. Lediglich das Plasmid pMMB67EH war nur in einen Teil der Stämme (*O. indolifex*, *R. denitrificans* und *R. litoralis*) transferierbar, konnte dort aber nicht stabil vererbt werden (Tab. 14).

Im Gegensatz zu den Plasmiden der IncQ-Gruppe waren die getesteten Stämme in den meisten Fällen nicht mit den IncP-Plasmiden pUCP20T, pLAFR3 und pFLP2 transformierbar. Das Plasmid pUCP20T ließ sich in die Stämme *O. indolifex*, *R. denitrificans* und *R. litoralis* transferieren, konnte aber, wie bereits für pMMB67EH beschrieben, in den Zellen nicht stabil vererbt werden. Gleiches galt für das Plasmid pLAFR3 in den Stämmen *O. indolifex* und *R. denitrificans* sowie für pFLP2 in *R. litoralis*. In fast all diesen Fällen verloren die Zellen das Plasmid bereits während der ersten Kultivierung in nicht-selektivem Medium.

Die hier verwendeten Plasmide der IncP-Gruppe sind bereits für die Transformation einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien erfolgreich genutzt worden (Staskawicz *et al.*, 1987; Schweizer, 1996; Hoang *et al.*, 1998). Dass sie sich in den transformierten Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe nicht stabil etablieren können, weist auf eine Inkompatibilität zu den natürlichen Plasmiden der Stämme hin. Plasmide sind inkompatibel zueinander, wenn sich ihre Kontrollmechanismen für die Replikation stark ähneln (Couturier *et al.*, 1988). Aufgrund der Ähnlichkeit ihres Replikationsursprunges (*oriR*) kompetitieren die Plasmide während ihrer Replikation miteinander. In solch einem Fall wird eines der Plasmide nicht an die Tochterzellen weitergegeben (Novick, 1987). Demnach können mehrere Plasmide nur stabil in einer Zelle koexistieren, wenn sie unterschiedlichen Inkompatibilitätsgruppen angehören.

Die Stämme der *Roseobacter*-Gruppe besitzen eine Vielzahl an natürlichen Plasmiden, so dass die Wahrscheinlichkeit der Inkompatibilität zu einem eingebrachten Plasmid relativ hoch ist. So trägt z.B. *D. shibae* fünf natürliche Plasmide, von denen allein vier ein Toxin-

Antitoxin-System besitzen (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Dieses System besteht aus einem Genpaar, welches für zwei Elemente kodiert: ein stabiles Toxin, sowie ein instabiles Antitoxin. Während das Toxin dauerhaft in der Zelle vorliegt, muss das Antitoxin regelmäßig nachgebildet werden, damit die Zelle überleben kann. Wird das Plasmid während der Zellteilung verloren, so wird die Tochterzelle nach Abbau des Antitoxins getötet (Kamada *et al.*, 2003). Somit ist das Fortbestehen des Plasmides in den Zellen sichergestellt. Es liegt somit nahe, dass die transferierten IncP-Plasmide die gleiche Inkompatibilitätsklasse wie eines der natürlichen Plasmide der Stämme der *Roseobacter*-Gruppe besitzen und aufgrund eines solchen Kontrollsystems nicht repliziert werden können.

4.1.4 Etablierung eines Reporter-gen-Systems

Untersuchungen der transkriptionellen Regulation sowie Analysen von Promotoraktivitäten benötigen ein funktionelles Reporter-gen-Fusionssystem. Für *Sulfitobacter* existiert bereits ein System, welches *lacZ*-Reporter-gen-Fusionen verwendet (Curson *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde ein neues Reporter-gen-Fusionssystem etabliert, welches auf Derivaten des *Broad Host Range* Vektors pRhokHi-2-FbFP basiert (Katzke *et al.*, 2010). Dieser Vektor basiert auf dem Vektor pBBR1MCS, für welchen erfolgreich der Transfer und die Stabilität in Stämme der *Roseobacter*-Gruppe gezeigt werden konnte (siehe Kap. 4.1.3.3 und Kap. 4.1.3.4). Er trägt ein Reporter-gen, welches für ein sauerstoff-unabhängiges, Flavin-Mononukloetid basiertes fluoreszierendes Protein (FbFP) kodiert. Dies ermöglicht *in vivo* Untersuchungen unter aeroben wie unter anaeroben Bedingungen, und stellt somit einen Vorteil gegenüber dem häufig verwendeten Reporterprotein Gfp dar, welches Sauerstoff für die Ausbildung seiner Fluoreszenz benötigt (Drepper *et al.*, 2007). Von diesem Vektor existieren drei Derivate. pRhokHi-2-BsFbFP kodiert für ein modifiziertes FbFP-Protein aus *Bacillus subtilis*, pRhokHi-2-PpFbFP für eines aus *Pseudomonas putida* und pRhokHi-2-EcFbFP ist eine für den Codongebrauch von *E. coli* modifizierte Form des Vektors pRhokHi-2-BsFbFP. Die verschiedenen Derivate erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass eine Variante für den *Codon bias* der getesteten Stämme besonders geeignet ist, und die Produktion des FbFP dadurch auf einem hohen Niveau stattfindet.

Die Funktionalität der Plasmide in den Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe wurde durch

Ergebnisse und Diskussion

Fluoreszenzmessung mit dem Lumineszenzspektrometer geprüft. Dazu wurden sie mittels Konjugation in die Stämme transferiert und mit Hilfe des Selektionsmarkers Kanamycin selektiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der *fbfp*-exprimierenden Rezipientenstämme gemessen und mit der der Wildtypstämme verglichen. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurden die Zellen mit Licht der Wellenlänge 450 nm angeregt, und die Emission bei 475 bis 550 nm gemessen.

Für die Stämme *O. indolifex*, *P. gallaeciensis* und *R. denitrificans* konnten für die transformierten Stämme Fluoreszenzsteigerungen gemessen werden. Die relativen Fluoreszenzintensitäten dieser transformierten Stämme im Vergleich zu ihrem jeweiligen Wildtypstamm sind in Abbildung 5 dargestellt.

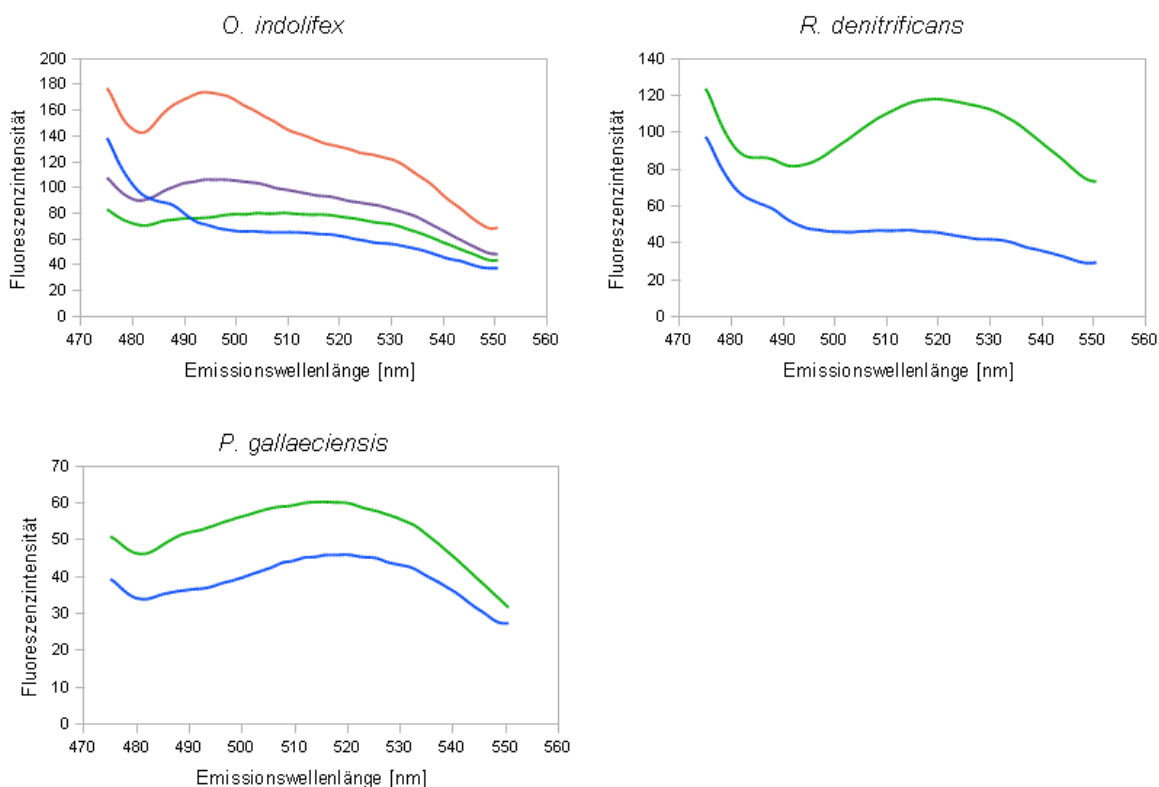


Abbildung 5: Vergleich der relativen Fluoreszenz der mit pRhokHi-2-FbFP transformierten Stämme *O. indolifex*, *P. gallaeciensis* und *R. denitrificans* mit dem jeweiligen Wildtypstamm. Die mittels Konjugation transformierten Stämme wurden 48 h bei 30 °C und 200 rpm in hMB kultiviert. Nach Ermittlung der optischen Dichte wurden die Kulturen mit 1,7 %iger (w/v) Meersalzlösung auf eine $OD_{578} = 0,7$ verdünnt und ihre Fluoreszenz bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 450 nm, die Emission wurde bei 475-550 nm gemessen. Um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu berücksichtigen, wurde mit dem jeweiligen Wildtypstamm genauso verfahren. Wildtypstamm (blaue Linie), mit pRhokHi-2-EcFbFP transformierter Stamm (grüne Linie), mit pRhokHi-2-BsFbFP transformierter Stamm (rote Linie), mit pRhokHi-2-PpFbFP transformierter Stamm (magentafarbene Linie).

Der Vektor pRhokHi-2-FBFP ist in *O. indolifex* funktionell. Während die Varianten pRhokHi-2-EcFbFP und pRhokHi-2-PpFbFP eine 1,2- bzw. 1,5-fache Steigerung der Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp zeigten, wurde mit der Variante BsFbFP eine 2,1-fache Steigerung der Fluoreszenzintensität detektiert (Abb. 5). Für *R. denitrificans* konnte mit der 2,5-fachen Fluoreszenzintensität eine deutliche Steigerung des mit der EcFbFP-Variante transformierten Stammes im Vergleich zum Wildtypstamm gemessen werden. Für *P. gallaeciensis* ließ sich mit der EcFbFP-Variante eine 1,7-fache Steigerung der Fluoreszenzintensität detektieren. Dass sich die Intensitäten zwischen den einzelnen Stämmen unterscheiden, kann vielerlei Gründe haben. So ist es denkbar, dass von den Plasmiden unterschiedliche Anzahlen von Kopien in den Zellen vorliegen. Auch verschieden starke Promotorleistungen oder die unterschiedlich häufige Nutzung der vorhandenen Codons zwischen den einzelnen Arten können eine Erklärung hierfür sein. Die Häufigkeit des Genproduktes FbFP sowie dessen gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zellen wurde zusätzlich mit Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Aufnahme des mit der Variante pRhokHi-2-PpFbFP transformierten Stammes *O. indolifex*.

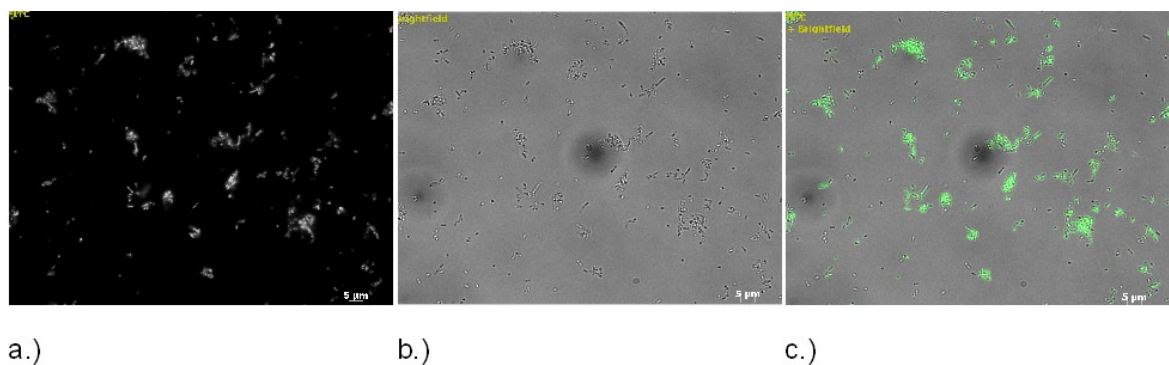


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *O. indolifex* pRhokHi-2-PpFbFP in 63-facher Vergrößerung. a.) Fluoreszenz bei 450 nm Extinktion, 520 nm Emission; b.) Hellfeld; c.) Überlagerung beider Aufnahmen.

Die Ergebnisse zeigen, dass das getestete Reportersystem für verschiedene Stämme der *Roseobacter*-Gruppe zur *in vivo*-Fluoreszenzmessung verwendet werden kann.

4.2 Identifizierung sekretierter Proteine von *Dinoroseobacter shibae*

Die Sekretion von Proteinen ist ein charakteristisches Merkmal für eine Vielzahl mariner Bakterienarten (Priest, 1984; Hollibaugh und Azam, 1983; Hoppe, 1983; Martinez *et al.*, 1996). Mit Hilfe dieser sekretierten Enzyme können so u.a. in der Umgebung vorliegende Makromoleküle zu Mono- oder Oligomeren hydrolysiert, von den Zellen aufgenommen und dem Metabolismus zugeführt werden (Hollibaugh und Azam, 1983; Hoppe *et al.*, 1988; Chróst *et al.*, 1989).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Proteine die verschiedenen Stämme der *Roseobacter*-Gruppe sekretieren. Dazu wurden Enzymaktivitätstests mit Substratagarplatten sowie photometrische Enzymaktivitätsbestimmungen durchgeführt. Mittels Genomanalyse wurden die potentiell sekretierten Enzyme bestimmt. Hierbei musste allerdings auf das noch nicht sequenzierte Genom von *P. inhibens* T5^T verzichtet werden. Weiter war für diese Untersuchung des Sekretoms die Etablierung einer geeigneten Methode zur Isolierung und Konzentrierung sekretierter Proteine sowie ihrer Aufbereitung für die zweidimensionale (2D)-Gelelektrophorese notwendig. Gefolgt wurde die Elektrophorese von MALDI-TOF/MS-Analysen des Modellorganismus *D. shibae* DFL12^T.

4.2.1 Qualitativer Aktivitätsnachweis sekretierter Enzyme mit Substratagarplatten

Der Nachweis von ausgewählten sekretierten Enzymen von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe wurde qualitativ mittels entsprechenden Substratagarplattentests durchgeführt. Dabei wurden zellfreie Kulturüberstände sowie ausgestrichene Stämme auf das Vorhandensein von Protease-Aktivitäten mit Magermilchpulver, Phospholipase A- und C-Aktivitäten mit Eigelb, Hämolysin-Aktivitäten mit Schafsblut, Elastase-Aktivitäten mit Elastin, DNase-Aktivitäten mit DNA, Alginat-Lyase-Aktivitäten mit Bakterienalginat und Chitinase-Aktivitäten mit Chitin-Azurblau als Substrat untersucht (3.7.2). Das Entstehen einer Hydrolysezone war hier der Nachweis auf Substratabbau und somit vorhandene Enzymaktivität. Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine Substratagarplatte mit dem positiven Nachweis von DNase-Aktivität für den Stamm *D. shibae* DFL-12^T.

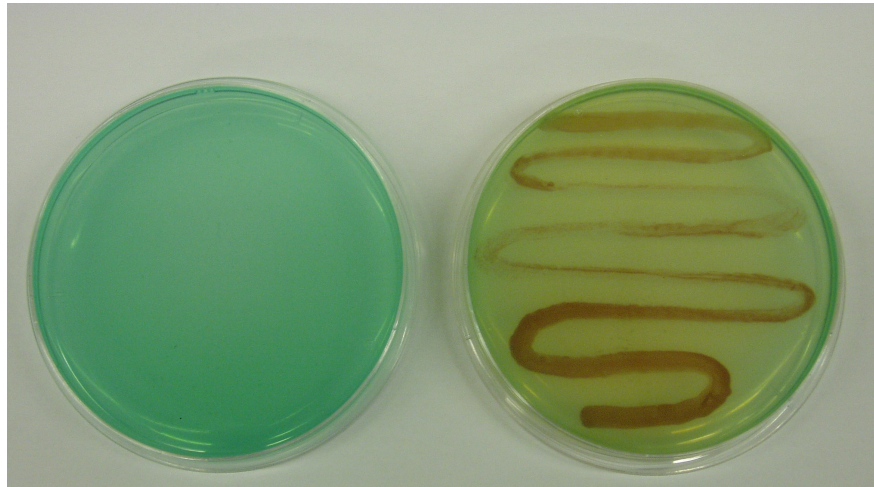


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung einer Substratagarplatte mit positivem Nachweis auf DNase-Aktivität. Links im Bild ist eine unbenutzte Substratagarplatte für den Nachweis von DNase-Aktivität dargestellt. Rechts im Bild befindet sich eine DNase-Testagarplatte, auf die der Stamm *D. shibae* DFL-12^T ausgestrichen wurde. Die Verfärbung der mit Methylgrün markierten DNA des Testmediums weist auf DNase-Aktivität des Stammes hin.

In Tabelle 15 sind die ermittelten Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 15: Qualitativ nachgewiesene Aktivitäten der sekretierten Enzyme von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe durch Substratagarplatten. Für den Nachweis ausgewählter Enzymaktivitäten wurden zellfreie Überstände von Kulturen in vorgestanzte Löcher ($\varnothing = 0,5$ cm) von Substratagarplatten gegeben, und zwei Tage bei 30 °C und im Anschluss bis zu fünf weitere Tage bei RT inkubiert. Genauso wurde mit den aus Glyceringefrierkulturen direkt auf die Substratagarplatten ausgestrichenen *Roseobacter*-Stämmen verfahren. Nach erfolgter Inkubation wurden Enzymaktivitäten durch die visuell erfassbare Umsetzung der Substrate bestimmt. Ü = zellfreier Überstand, S = aus Glyceringefrierkulturen ausgestrichener Stamm. (+) = Enzymaktivität, (-) = keine Enzymaktivität (+/-) = kein eindeutiges Ergebnis. Die Tabelle repräsentiert die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Doppelbestimmung.

Stamm	Protease		Hämolysin		Phospho- lipase A / C		DNase		Alginate- Lyase		Chitinase		Elastase	
	Ü	S	Ü	S	Ü	S	Ü	S	Ü	S	Ü	S	Ü	S
<i>D. shibae</i> DFL-12 ^T	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>O. indolifex</i> HEL-45 ^T	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. gallaeciensis</i> 2.10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. inhibens</i> T5 ^T	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>R. denitrificans</i> 7001 ^T	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>R. litoralis</i> 6996 ^T	-	+	-	+/-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Während bei keinem der sterilfiltrierten Überstände ein Substratabbau und somit eine Enzymaktivität gezeigt werden konnte, wiesen einige Substratagarplatten mit den ausgestrichenen Bakterienstämmen auf Aktivität sekretierter Proteine hin. So ließ sich für alle untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe mit Ausnahme von *P. inhibens* und *P. gallaeciensis* eine Protease-Aktivität nachweisen. Sekretierte Proteasen wurden bereits für eine Vielzahl mariner Bakterien beschrieben (Olivera *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). Ein Abgleich mit der IMG-Datenbank (Markowitz und Kyrpides, 2007) zeigte, dass die hier untersuchten Stämme, deren Genomsequenz zugänglich ist, eine oder mehrere annotierte Proteasen besitzen, die eine Sequenz für ein Signalpeptid zeigen. Ob diese periplasmatisch, zelloberflächen-assoziiert oder extrazellulär lokalisiert sind kann allerdings nur experimentell aufgeklärt werden. Die hier durchgeführten Experimente sind der erste Hinweis auf sekretierte Enzyme von Stämmen der *Roseobacter*-Gruppe.

Der Nachweis von Hämolyisin-Aktivität war nur für die Stämme *P. inhibens* und *R. litoralis* schwach positiv, obwohl mittels der IMG-Datenbank in allen verfügbaren Genomen der untersuchten Stämme jeweils ein oder mehrere putative Gene gefunden werden konnten, die für sekretierte Proteine der Hämolyisin D (HlyD)-Familie kodieren. Diese Membranfusionsproteine sind in den Export vieler Stoffe involviert und bilden zusammen mit einem ABC-Transporter und einem Außenmembranprotein (*outer membrane protein*, OMP) ein funktionelles Typ I-Sekretionssystem. In einer Vielzahl Gram-negativer Bakterien wird dieser Typ I-Sekretionsmechanismus für die Sezernierung von Toxinen, Proteasen und Lipasen verwendet (Henderson *et al.*, 1998). Das bekannteste Beispiel ist hierbei die Sekretion von Hämolyisin A, welches in dem Modellorganismus *E. coli* von dem *hlyCABD*-Operon kodiert (Pimenta *et al.*, 2005) wird. In den hier untersuchten Genomen liegen entsprechende Gene für die HlyD-Proteine zwar häufig in einem Cluster mit denen für ABC-Transporter und auch teils mit denen für OMPs vor, jedoch in Abwesenheit eines solchen Hämolyisin-kodierenden Genes. Auch bei dem geringe Hämolyisinaktivität zeigenden Stamm *R. litoralis* konnte kein entsprechendes kodierendes Gen identifiziert werden. Es ist allerdings möglich, dass ein solches Enzym-kodierendes Gen für dieses Transportsystem an anderer Stelle im Genom vorliegt.

Der Nachweis auf Phospholipase-Aktivität in der Umgebung der ausgestrichenen Stämme zeigte einen geringfügig positiven Effekt bei *R. litoralis*, *R. denitrificans* und

D. shibae DFL-12^T (Tab. 15). Laut IMG-Datenbank besitzt sowohl *R. litoralis* als auch *D. shibae* DFL-12^T jeweils ein Gen für eine Signalpeptid-tragende Phospholipase, was das Ergebnis des Substratagarplattentests stützt. Alle sechs getesteten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe zeigten außerdem einen positiven Nachweis für DNase-Aktivität. Dieses Ergebnis wurde durch einen Vergleich mit den zugänglichen Genomen der IMG-Datenbank bestätigt. Alle überprüften Genome besaßen mehrere für DNasen kodierende Gene. Bis auf den Nachweis für DNase-Aktivität waren die gebildeten Hydrolysezonen (bei dem Protease-, Hämolyisin- und Phospholipase-Nachweis) in allen Fällen sehr klein. Aktivitäten von Alginat-Lyase, Chitinase sowie Elastase war mit den durchgeführten Substratagarplattentests nicht nachweisbar.

Da die Menge sekretierter Proteine im Überstand relativ gering sein kann, besteht die Möglichkeit, dass die produzierten Mengen extrazellulärer Enzyme nicht ausreichten, um das Substrat der Testagarplatten umzusetzen oder so viel Substrat umzusetzen dass es visuell erkennbar war. Obwohl diese Methode als sehr sensitiv beschrieben ist, unterscheiden sich die minimalen Sensitivitäten für die einzelnen Enzyme (Madler *et al.*, 1976). Ebenso ist es möglich, dass die in dem sterilen Überstand vorhandenen Enzyme schnell ihre biologische Aktivität verlieren, so dass die Aktivität der Überstände schon nach kürzester Zeit nicht mehr messbar ist. Dem gegenüber sekretieren die ausgestrichenen Bakterienstämme kontinuierlich degradierendes Enzym, welches eine Substratumwandlung zur Folge hat. In der Literatur sind für einige marine Stämme sekretierte Enzyme wie z.B. Proteasen und alkalische Phosphatasen beschrieben, welche Zelloberflächen-assoziiert bzw. periplasmatisch vorliegen (Martinez und Azam, 1993; Hollibaugh und Azam, 1983; Chróst, 1991). Folglich sollte für diese Enzyme ein positiver Nachweis auf den Substratagarplatten nur bei den ausgestrichenen Stämmen erfolgen.

Generell konnten nur wenige sekretierte Enzyme mit dieser Methode nachgewiesen werden, was jedoch nicht bedeutet, dass diese von den untersuchten Stämmen nicht produziert werden. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass einige Enzyme nicht konstitutiv sondern nur unter bestimmten Umweltbedingungen von den Zellen produziert und sekretiert werden. So ist in der Literatur beschrieben, dass einige Bakterienarten eine konstitutive Alginat-Lyase-Aktivität im Überstand zeigen, wohingegen diese Aktivität im Überstand für viele Bakterienarten nur nachweisbar ist, wenn diese in Anwesenheit des

Substrats kultiviert werden (Matsushima *et al.*, 2010). Auch für die Hydrolyse des Polysaccharids Chondroitin wurde postuliert, dass nur sehr geringe Mengen der Chondroitinase konstitutiv produziert werden bis die Enzymproduktion durch die Anwesenheit des Hydrolyseproduktes gesteigert wird (Arnosti, 2003; Ziervogel und Arnosti, 2008). Daneben existieren weitere Faktoren, die die Produktion und Sekretion von Enzyme beeinflussen. So kann diese z.B. als Hungerantwort auf ein sehr geringes Nährstoffangebot (Albertson *et al.*, 1990) oder in Abhängigkeit von der Wachstumsphase gesteigert werden (Antranikian, 1992). Es ist bekannt, dass Bakterien viele extrazelluläre Proteine verstärkt nach Erreichen der stationären Wachstumsphase produzieren (Pocsfalvi, 2008; Antelmann *et al.*, 2001). Demnach ist es möglich, dass die Inkubationszeit von 24 h nicht ausreichend war, um nachweisbare Mengen einiger der extrazellulären Enzyme zu produzieren. Die längere Inkubationszeit sowie die höheren Zelldichten auf den Agarplatten würden somit erklären, warum das Substrat bei den ausgestrichenen Stämmen umgesetzt werden konnte, wohingegen in den sterilen Überständen keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Für Zelloberflächen- oder Aggregat-assoziierte Exoenzyme wäre eine geänderte Versuchsanordnung sinnvoll. So konnte in Versuchen gezeigt werden, dass die Kultivierung mariner Bakterien in Aggregaten aus extrapolymeren Substanzen (EPS) die Produktion sekretierter Proteine signifikant steigerte (Grossart *et al.*, 2006).

4.2.2 Photometrischer Nachweis sekretierter Proteine

Zum Nachweis sekretierter Enzyme wurden zusätzlich photometrische Bestimmungen durchgeführt. Es wurde die Alginat-Lyase-Aktivität mit Bakterienalginat als Substrat, die alkalische Phosphatase-Aktivität mit p-Nitrophenylphosphat, die Esterase-Aktivität mit p-Nitrophenylacetat und die Protease-Aktivität mit Azocasein als Substrat nachgewiesen (3.7.3).

Für diese Untersuchung wurden die Stämme 24 h in MB bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Für die Durchführung der Nachweise wurde entweder die Bakterienkultur direkt oder der zellfreie Überstand nach Abtrennung der Zellen durch Filtration (Celluloseacetat, Porendurchmesser 0,2 µm) verwendet. Da eine Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben aufgrund ihres hohen Salzgehaltes nicht möglich war, konnten die Ergebnisse der photometrischen Bestimmung lediglich für einen relativen quantitativen Nachweis von

extrazellulären Enzymen herangezogen werden. Hierbei wurden die erhaltenen Enzymaktivitäten jeweils auf 1 ml des zellfreien Überstandes bzw. der Bakterienkultur bezogen.

Die Aktivität sekretierter Proteasen konnte hier für alle untersuchten Stämme der *Roseobacter*-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 8).

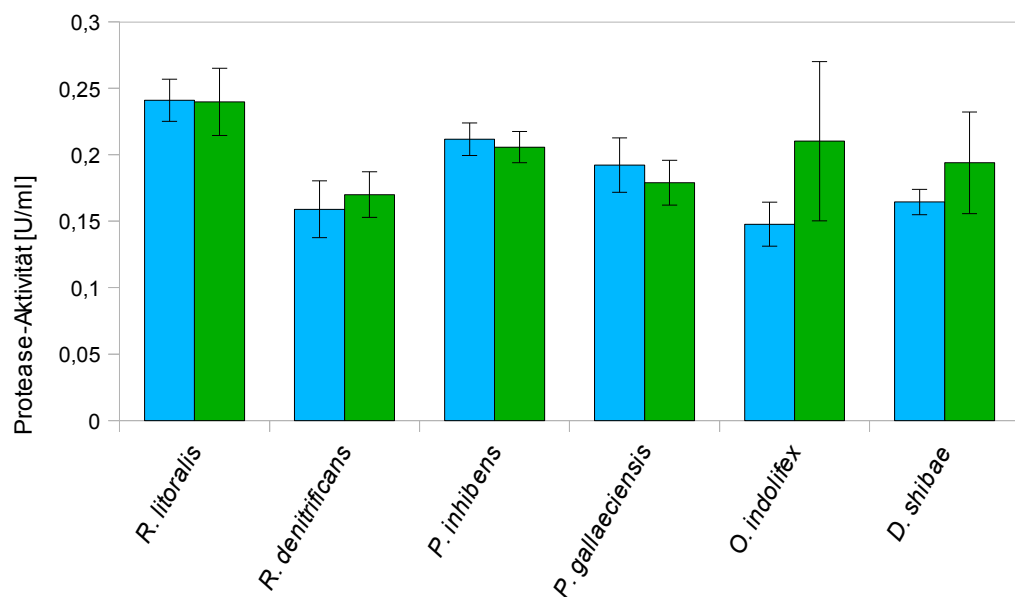


Abbildung 8: Photometrischer Nachweis sekretierter Proteasen. Die Aktivität sekretierter Proteasen wurde mit zellfreien Überständen (blau) sowie Bakterienkulturen (grün) der *Roseobacter*-Stämme durchgeführt. Die Umsetzung des Substrates Azocasein diente hierbei als Nachweis für Protease-Aktivität [U/ml]. Das Ergebnis stellt den Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dar. Die jeweilige Standardabweichung ist angegeben.

Hierbei unterschied sich die Höhe der gemessene Aktivität im zellfreien Überstand kaum merklich von der der Bakterienkulturen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den sekretierten Proteasen um extrazellulär vorliegende Enzyme handelt und diese nicht an den Zelloberflächen lokalisiert sind. Das Ergebnis deckt sich weitestgehend mit dem des Substratagarplattentests (4.2.1). Mit Hilfe der photometrischen Methode konnten jedoch auch Protease-Aktivitäten für die beiden *Phaeobacter*-Stämme detektiert werden, was auf eine höhere Sensitivität der Methode schließen lässt.

Ebenfalls konnte die Aktivität sekretierter Esterasen nachgewiesen werden (Abb. 9).

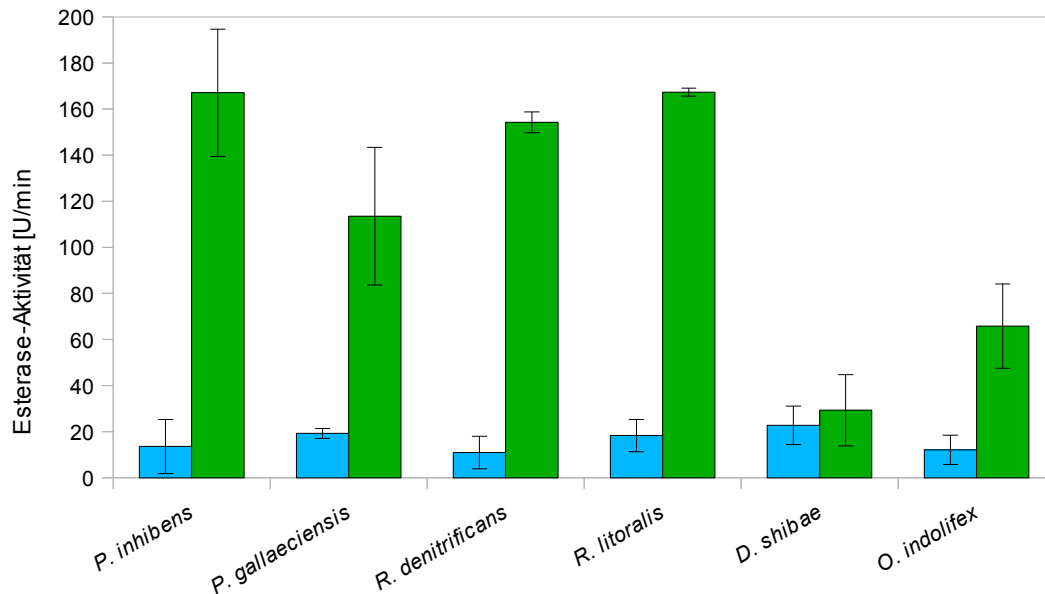


Abbildung 9: Photometrischer Nachweis sekretierter Esterasen. Die Aktivität sekretierter Esterasen wurde mit zellfreien Überständen (blau) sowie Bakterienkulturen (grün) der Stämme durchgeführt. Dargestellt ist die ermittelte Esterase-Aktivität [U/min]. Dazu wurde die Umsetzung des Substrates p-Nitrophenylacetat zu p-Nitrophenol gemessen. Das Ergebnis stellt den Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dar. Die Standardabweichung ist angegeben.

Während nur geringe Esterase-Aktivitäten in den zellfreien Überständen messbar waren, zeigten die Messungen in den Bakterienkulturen eindeutig höhere Mengen. Lediglich für *D. shibae* konnte kaum extrazelluläre Esteraseaktivität festgestellt werden. Die geringe Esterase-Aktivität der zellfreien Überstände im Vergleich zu den Bakterienkulturen deutet darauf hin, dass es sich bei diesem Enzym um ein Zelloberflächen-assoziiertes bzw. periplasmatisches Protein handelt.

Die Aktivität sekretierter alkalischer Phosphatasen ließ sich nur bei zwei der sechs untersuchten Stämme nachweisen (Abb. 10).

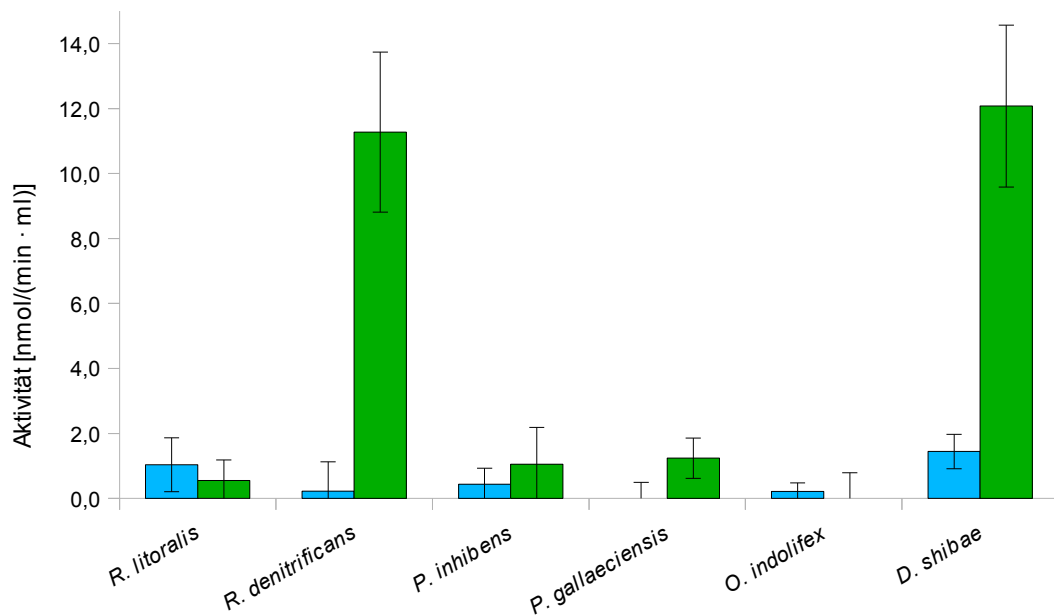


Abbildung 10: Photometrischer Nachweis sekretierter alkalischer Phosphatasen. Die Aktivität sekretierter alkalischer Phosphatasen wurde in zellfreien Überständen (blau) sowie Bakterienkulturen (grün) der Stämme bestimmt. Hierzu wurde die Umsetzung des Substrates p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol gemessen. Dargestellt ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase in nmol/(min · ml). Das Ergebnis stellt den Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen dar. Die Standardabweichung ist angegeben.

Lediglich in den *R. denitrificans* und *D. shibae* Kulturen war der Nachweis sekretierter alkalischer Protease positiv, was auf Zelloberflächen-assoziierte oder periplasmatisch-vorliegende Protease schließen lassen kann.

Der Nachweis für sekretierte Alginat-Lyase fiel sowohl für die zellfreien Überstände als auch für die Bakterienkulturen für alle getesteten Stämme negativ aus (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis stimmt mit dem durch Substratagarplattentest erhaltenen Resultat überein (Kap. 4.2.1).

Auch wenn durch die erhöhte Sensitivität der photometrischen Bestimmung der relative quantitative Nachweis verschiedener extrazellulärer Enzyme möglich war, so sind dieser Methode doch Grenzen gesetzt. So störte die hohe Salzkonzentration im Medium weitere

durchgeführte Nachweisreaktionen. Für eine genauere Charakterisierung von sekretierten Enzymen wurde deshalb das Sekretom des Modellorganismus *D. shibae* mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese gefolgt von MALDI-TOF/MS-Analyse untersucht.

4.2.3 Charakterisierung sekretierter Proteine von *Dinoroseobacter shibae* mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und MALDI-TOF/MS

Zur Bestimmung sekretierter Proteine aus *D. shibae* DFL-12^T wurden Sekretomanalysen durchgeführt. Dabei wurde die Gesamtheit aller sich außerhalb der Cytoplasmamembran befindlichen Proteine als Sekretom definiert. Dazu zählten neben extrazellulär vorliegenden Proteinen auch solche, die periplasmatisch oder Zelloberflächen-assoziiert vorlagen.

4.2.3.1 Etablierung geeigneter Methoden zur Isolierung sekretierter Proteine aus Kulturüberständen von *Dinoroseobacter shibae*

Da die Konzentration sekretierter Proteine in den zellfreien Kulturüberständen von *D. shibae* relativ gering war (Kap. 4.2), bestand die Notwendigkeit, geeignete Methoden zur Isolierung und Konzentrierung dieser Proteine zu etablieren. Dazu wurden verschiedene Protein-Präzipitationsmethoden daraufhin getestet, ausreichende Mengen Protein für die sich anschließende 2D-Gelelektrophorese zu gewinnen.

Die Darstellung aller in einem Proteingemisch enthaltenen Proben mittels 2D-Gelelektrophorese ist in der Praxis nicht möglich. Die unterschiedliche physikalisch-chemische Natur der einzelnen Proteine verhindert, dass bei der Probenaufbereitung die Präzipitation aller Proteine mit nur einer Methode gelingt (Askonas, 1951). So erhöht sich z.B. die Löslichkeit stark hydrophober, integraler Membranproteine durch die Herabsetzung der Polarität einer Lösung, während hydrophile Proteine präzipitieren. Für die Analyse eines Proteingemisches mittels 2D-Gelelektrophorese ist demnach die Wahl einer geeigneten Präzipitationsmethode sowie der weiteren Probenaufbereitung von großer Bedeutung, um die höchstmögliche Anzahl der in der Probe enthaltenen Proteine darstellen zu können (Xavier *et al.*, 2010). Chemikalien wie Chloroform, Methanol, Aceton oder Trichloressigsäure werden häufig als Präzipitationsmittel verwendet, jedoch können die einzelnen Methoden einen negativen Einfluss auf die massenspektrometrische Untersuchungen haben. So erschweren in Proteinproben verbleibende Reste von Aceton,

welches die selektive Modifikation von Peptiden bewirkt, die massenspektrometrische Auswertung (Simpson und Beynon, 2010). Proteinproben für die 2D-Gelelektrophorese sollten möglichst hohe Proteinkonzentrationen aufweisen und frei von störenden Komponenten wie Salzen, Detergenzien, Nukleinsäuren und Lipiden sein (Antonioli *et al.*, 2009; Garcia-Rodriguez *et al.*, 2003). Die Beseitigung derartiger störender Komponenten birgt allerdings die Möglichkeit, in der Probe enthaltene Proteine ebenfalls zu eliminieren. Die sich anschließende 2D-Gelelektrophorese würde somit ein nicht-repräsentatives Bild der Proteinzusammensetzung liefern (Xavier *et al.*, 2010).

Um massenspektrometrische Analysen sekretierter Proteine von *D. shibae* nach erfolgter 2D-Gelelektrophorese durchführen zu können, musste zuvor eine geeignete Methode der Proteinpräzipitation etabliert werden. Dazu wurden zellfreie Kulturüberstände von *D. shibae* Kultivierungen in Salzwassermedium (SW) und SW mit einem Zusatz von 0,1 % (w/v) Chitin für verschiedene gängige Fällungsmethoden wie die Chloroform-Methanol-Fällung, Acetonfällung, Ammoniumsulfatfällung, Polyethylenglykol (PEG)-Fällung und Hitzefällung verwendet (Kap. 3.7.4). Nach erfolgter Präzipitation wurden die Proteine in MilliQ Wasser suspendiert und die Güte der Fällung auf einem SDS-Polyacrylamidgel durch Silberfärbung kontrolliert. Zum besseren Vergleich der Fällungsmethoden wurde jeweils das Volumen einer Probe aufgetragen, das 100 µl zellfreiem Überstand entsprach. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt.

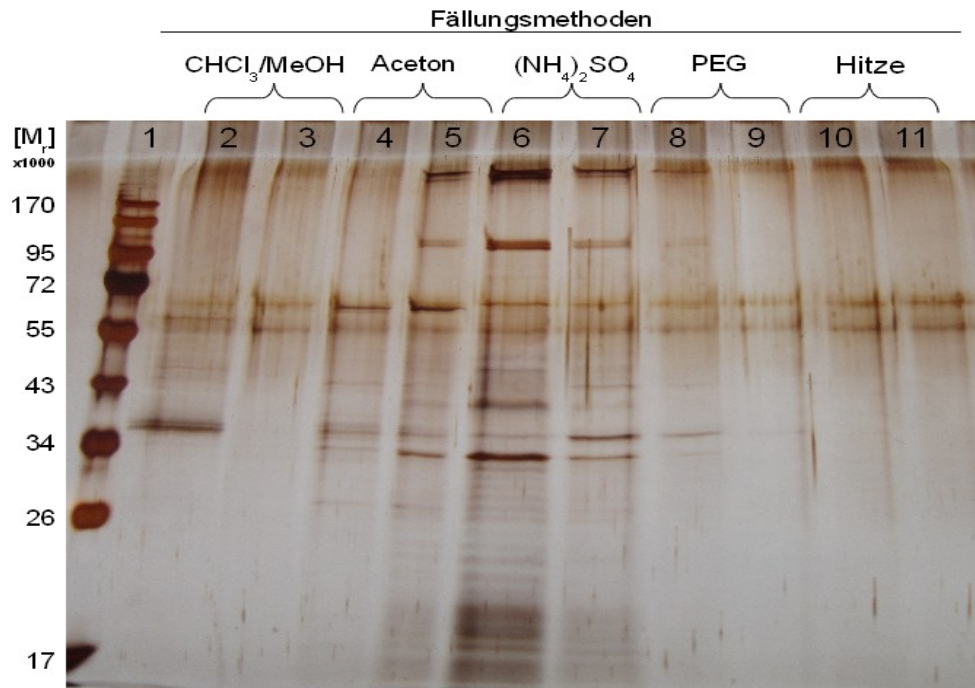


Abbildung 11: Vergleich verschiedener Präzipitationsmethoden für sekretierte Proteine von *D. shibae* mittels SDS PAGE Gelelektrophorese. Dargestellt sind die mit Chloroform-Methanol (Spur 2 und 3), mit Aceton (Spur 4 und 5), mit Ammoniumsulfat (Spur 6 und 7), mit Polyethylenglykol (PEG) (Spur 8 und 9) und Hitze (Spur 10 und 11) gefällten Proteine. Für die Präzipitationen wurden zellfreie Überstände der Kultivierungen von *D. shibae* in 50 ml SW-Medium (Spuren mit gerader Zahl) und in 50 ml SW-Medium mit 0,1 % (w/v) Chitin (Spuren mit ungerader Zahl) für 40 h bei 30 °C verwendet. Die aufgetragene Menge des Proteingemisches entsprach jeweils der Menge Protein, die aus 100 µl zellfreiem Überstand präzipitiert wurde. Spur 1 zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1000). Die Trennung erfolgte in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die Präzipitation extrazellulärer Proteine mittels Hitze- oder PEG-Fällung ist für sekretierte Proteine aus *D. shibae* nicht geeignet (Spur 8 bis 11). Das SDS-Polyacrylamidgel zeigte für diese Fällungsmethoden lediglich wenige, zudem schwache Proteinbanden, welche auch mit allen anderen Fällungsmethoden detektiert werden konnten. Das Bandenmuster der Chloroform-Methanol-Fällung (Spur 2 und 3) hingegen wies im Bereich von ca. 34 bis 55 kDa einige zusätzliche, meist allerdings ebenso schwache Banden auf. Wesentlich vielfältigere Bandenmuster waren bei der Acetonfällung (Spur 4 und 5) sowie der Ammoniumsulfatfällung (Spur 6 und 7) erkennbar. Hierbei waren bei der Ammoniumsulfatfällung die Banden intensiver angefärbt. Bei der Silberfärbung handelt es sich nicht um eine quantitative Färbemethode. Allerdings wurden hier aus gleichen Ausgangsmengen identischer Proben Proteine gefällt und miteinander verglichen. Somit lässt sich die Aussage treffen, dass die Ammoniumsulfatfällung von den hier

getesteten Fällungsmethoden in qualitativer wie quantitativer Hinsicht die am besten geeignete Methode der Proteinpräzipitation aus *D. shibae* Kulturüberständen darstellt.

Die präzipitierten sekretierten Proteine aus der Kultivierung von *D. shibae* in SW mit 0,1 % (w/v) Chitin anstelle von SW führte zu keinem veränderten Bandenmuster. Erkennbare Unterschiede der beiden Kultivierungen bei den jeweiligen Präzipitationsmethoden rühren von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen her.

4.2.3.2 Präzipitation sekretierter Proteine aus zellfreien Kulturüberständen von *Dinoroseobacter shibae*

D. shibae wurde in 2 l SW-Medium bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Da die Inkubation über 41 h verlief, befand sich die Kultur bereits seit etwa 4 h in der stationären Wachstumsphase. Nach dieser Zeit wurde der zellfreie Überstand der Kultur gewonnen (Kap. 3.7.4.2). Um auszuschließen dass der Überstand cytoplasmatische Proteine lysierter Zellen enthielt, wurde die Aktivität des cytoplasmatischen Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase im zellfreien filtrierten Überstand bestimmt. Dieser Test wurde bereits mehrfach für Sekretomanalysen eingesetzt und hat sich als zuverlässig erwiesen (Calcott und MacLeod, 1975; Martinez und Azam, 1993). Konnte keine Aktivität des cytoplasmatischen Proteins im Überstand gemessen werden, wurde er für die Proteinpräzipitation verwendet. In Abbildung 12 ist das Ergebnis der G6PD-Aktivitätstest mit dem zellfreien Überstand aus der Kultivierung von *D. shibae* in SW-Medium gezeigt.

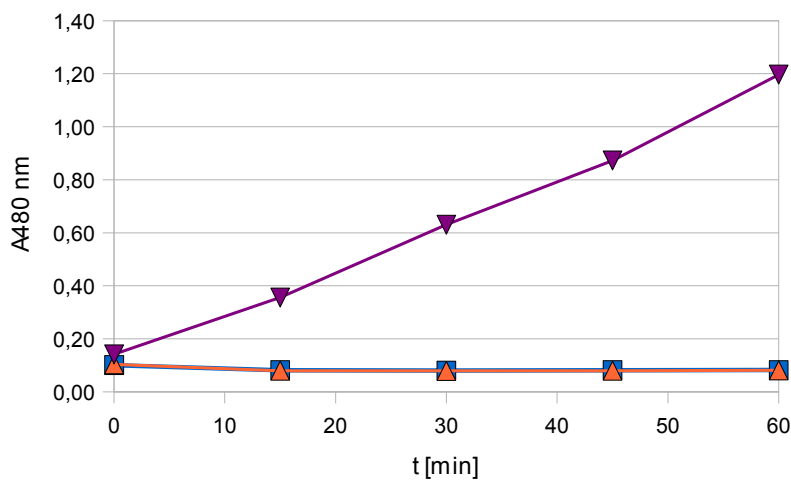


Abbildung 12: Bestimmung der G6PD-Aktivität. Dargestellt ist das Ergebnis der G6PD-Aktivitätsbestimmung im zellfreien Kulturüberstand aus der Kultivierung von *D. shibae* in SW-Medium. Positivkontrolle: G6PD aus *Leuconostoc mesenteroides* (magenta), Probe: zellfreier Kulturüberstand (blau), Negativkontrolle (orange).

Während die Absorption der Positivkontrolle bei 480 nm über eine Stunde hinweg stetig zunahm, änderte sich die Absorption des zellfreien Kulturüberstandes, ebenso wie die Negativkontrolle, über den gesamten untersuchten Zeitraum nicht. Eine Verunreinigung des zellfreien Überstandes durch cytoplasmatisches Protein konnte hierdurch ausgeschlossen werden.

4.2.3.3 2D-Gelelektrophorese der sekretierten Proteine aus *Dinoroseobacter shibae* kultiviert in SW-Medium

Die Proteine aus 2 l zellfreiem Kulturüberstand wurden mittels Ammoniumsulfatfällung präzipitiert (Kap. 3.7.4.4) und in ca. 20 ml MilliQ Wasser suspendiert. Um das durch die Fällung eingetragene Salz zu entfernen, wurde die Proteinlösung gegen MilliQ Wasser dialysiert und anschließend konzentriert (Kap. 3.7.4.4 und Kap. 3.7.4.5). Nach erfolgtem Pufferaustausch wurde die Proteinlösung mittels 2D-Gelelektrophorese elektrophoretisch getrennt (Kap. 3.7.6) und die Proteine über Silberfärbung visualisiert.

In Vorversuchen wurde hierzu ermittelt, welche Gesamtmenge Protein eingesetzt werden muss, um detektierbare Mengen der einzelnen Proteine zu erhalten.

Die Auftrennung des Proteingemisches nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) erfolgte während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) über einen pH-Wert von 3 bis 10. Hierzu

wurden immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Gelstreifen mit 100 µg, 150 µg und 200 µg Protein beladen. Im Anschluss erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer relativen molekularen Masse, gefolgt von einer Silberfärbung der Proteine. Hierbei zeigte sich, dass eine Proteinmenge von 100 µg für die Auftrennung und Färbung der Proteine am besten geeignet war. In Abbildung 13 ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Auftrennung von 100 µg des Proteingemisches dargestellt.

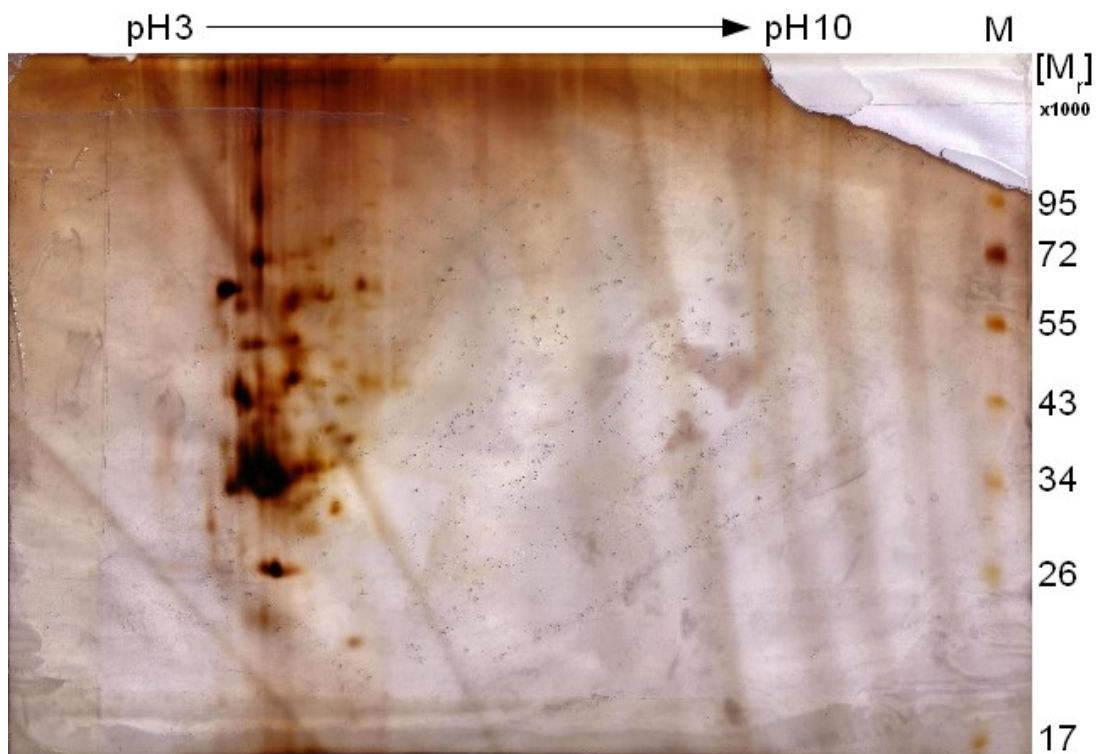


Abbildung 13: 2D-Gel des Sekretoms von *D. shibae*. Dargestellt ist die Auftrennung von 100 µg eines Proteingemisches sekretierter Proteine aus *D. shibae* kultiviert in SW-Medium. Während der IEF wurden die Proteine entsprechend ihres pI über einen pH-Bereich von 3 bis 10 aufgetrennt. Daraufhin erfolgte die Auftrennung nach ihrer relativen molekularen Masse auf 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen. Oberhalb des Gelbildes ist der pH-Bereich angezeigt, über den die Proteine in der IEF separiert wurden. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1000). Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

Das 2D-Gel zeigt einige teilweise stark gefärbte Proteine (Abb. 13). Die Silberfärbung bietet zwar den Vorteil, aufgrund ihrer hohen Sensitivität auch sehr geringe Mengen Protein (5 bis 30 ng) detektieren zu können, jedoch muss zur Visualisierung solch geringer Mengen das gefärbte Gel entsprechend lange entwickelt werden. Während dieser Dauer wird die Färbung quantitativ stärker verteilter Proteine ebenfalls weiter entwickelt, was

überproportional schnell zu „Überfärbungen“ sowie Anfärbungen des entsprechenden umgebenden Bereiches führt. Auf den Gelen mit 150 µg und 200 µg aufgetrenntem Proteingemisch führte die Anfärbung geringerer Mengen Protein zu einzelnen sehr stark überfärbten Proteinspots der quantitativ stärker vertretenen Proteine. Dies resultierte darin, dass nahe gelegene Proteine überfärbt wurden und somit einer weiteren Identifizierung nicht mehr zugänglich waren (Daten nicht gezeigt).

Für weitere Untersuchungen wurden daher jeweils 100 µg eines Proteingemisches separiert, da mit dieser Menge eine große Zahl Proteine detektierbar und für weitere Analysen zugänglich war. Dabei konnten im 2D-Gel eine Vielzahl sekretierter Proteine aus dem zellfreien Kulturüberstand von *D. shibae* detektiert werden (Abb. 13).

Auf dem Gel sind etwa 50 Proteine erkennbar. Die relative molekulare Masse der meisten Proteine beträgt 26 bis 72 kDa. Auffällig ist, dass sich der durchschnittliche isoelektrische Punkt zwischen ca. pH 3 und pH 5 befindet. Die Auftrennung eines Proteingemisches über einen breiten pH-Bereich wie hier pH 3 bis 10, limitiert dessen Auflösung. So können Proteine mit einem sehr ähnlichen pI und gleicher molarer Masse überlappen und bei der Detektion als ein einzelner Proteine erscheinen (Wagner *et al.*, 2002). Dies wiederum könnte ein Problem für die Identifizierung darstellen.

Um die Auflösung zu erhöhen, wurde für weitere Untersuchungen die IEF mit einem engeren pH-Bereich von 3 bis 6 durchgeführt. Im Anschluss an die Silberfärbung wurden zu identifizierende Proteine aus dem Gel ausgeschnitten und entfärbt. Das Ergebnis der Auftrennung sowie die Zuordnung der ausgeschnitten Proteine ist in Abbildung 14 dargestellt.

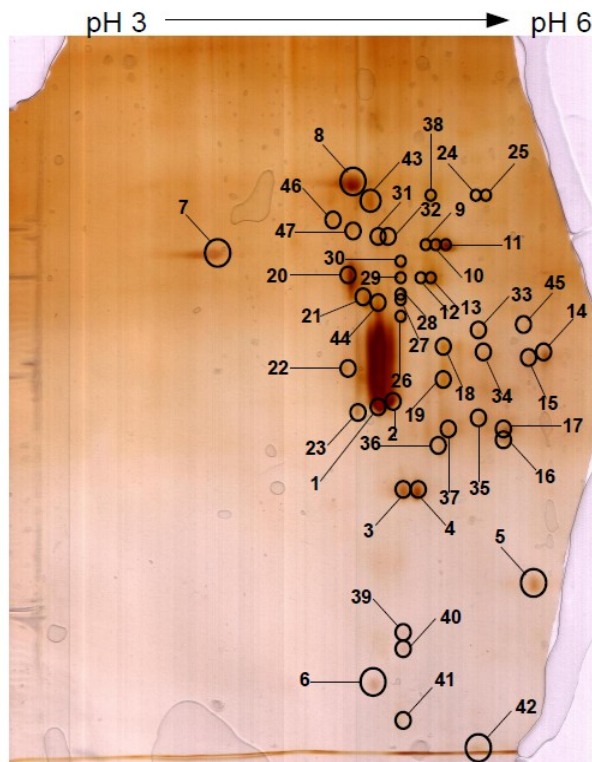


Abbildung 14: Sekretomanalyse von *D. shibae*. Dargestellt ist die Auftrennung von 100 µg eines Proteingemisches sekretierter Proteine von *D. shibae* kultiviert in SW-Medium. Während der IEF wurden die Proteine entsprechend ihres pI über einen pH-Bereich von 3 bis 6 aufgetrennt. Daraufhin erfolgte die Auftrennung nach ihrer relativen molekularen Masse auf 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen. Oberhalb des Gelbildes ist der pH-Bereich angezeigt, über den die Proteine in der IEF separiert wurden. Im Bild dargestellt ist die Zuordnung der zur Identifizierung der Proteine ausgeschnittenen Proteine.

Von den 47 ausgeschnittenen Proteinen wurden 40 anschließend mittels MALDI-TOF-MS vermessen und über Datenbanksuche identifiziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Nicht analysiert wurden die Proteine mit der Nr. 24, 34, 38, 41, 45, 46 und 47, da die Menge der zu analysierenden Proben limitiert war und diese Proben nur sehr geringe Mengen Protein aufzuweisen schienen.

Die Ergebnisse der Identifizierung sind in Tabelle 16 dargestellt. Dreiunddreißig der analysierten Proteine konnten identifiziert werden. Dabei wurden zwei als Gemisch aus zwei Proteinen identifiziert (Nr. 1 und Nr. 3). Sieben Proben waren nicht eindeutig identifizierbar (Nr. 6, 10, 12, 14, 36, 40 und 42). Probe Nr. 12 wies dasselbe Spektrum auf wie Probe Nr. 13. Von beiden Proben wurde nur letztere identifiziert. Von den identifizierten Proteinen existierten sieben in zweifacher Form auf dem 2D-Gel, eines in dreifacher Form. Dieses Mehrfachvorkommen einzelner Proteine ist erklärbar durch posttranslationale Modifikationen, partielle Degradation oder einer der Elektrophorese vorangegangenen, unvollständigen Denaturierung (Watt *et al.*, 2005). Abzüglich doppelt

vorliegender Proteine konnten somit insgesamt 26 sekretierte Proteine identifiziert werden, von denen laut bioinformatischer Analysen 20 ein Signalpeptid tragen.

Tabelle 16: Liste der identifizierten Proteine aus dem Sekretom von *D. shibae*. In der Tabelle aufgeführt ist die Nummer des jeweiligen Gelspots, mit der er in Abbildung 13 bezeichnet wurde, der für das identifizierte Protein kodierende Genlocus, die Beschreibung des Genproduktes, der isoelektrische Punkt (pI) des jeweiligen Proteins, seine nominale Masse M_r , die Abdeckung der analysierten Sequenz mit der des identifizierten Proteins sowie der Hinweis darauf, ob das Protein ein Signalpeptid trägt.

Spot-Nr.	Genlocus	Proteinbeschreibung	pI	nominale M_r	Sequenzabdeckung	Signalpeptid
Membrantransport (ABC-Transporter)						
1	Dshi_0318	Glutamat/Glutamin/Aspartat/Asparagin ABC Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,34	35797	75 %	ja
2	Dshi_0318	Glutamat/Glutamin/Aspartat/Asparagin ABC Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,34	35797	82 %	ja
3	Dshi_0628	ABC-Transporter, Wolframat Transportsystem, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,46	28859	32 %	ja
4	Dshi_0628	ABC-Transporter, Wolframat Transportsystem, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,46	28859	54 %	ja
13	Dshi_2014	Sn-Glycerol-3-phosphat ABC-Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,38	47078	28 %	ja
20	Dshi_1522	Aminosäure ABC-Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,15	40126	23 %	ja
21	Dshi_0974	ABC-Transporter für verschiedene Polyole, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,19	47453	23 %	ja
22	Dshi_2000	D-Xylose ABC-Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,18	35282	24 %	ja
23	Dshi_1941	NMT1/THI5 Familie	4,13	35532	67 %	ja
26	Dshi_1374	NMT1/TH5 ähnliches Domänenprotein	4,29	35667	36 %	ja
27	Dshi_2964	Nucleosid-bindendes Protein	4,58	42246	60 %	ja
28	Dshi_2964	Nucleosid-bindendes Protein	4,58	42246	60 %	ja
29	Dshi_0547	Kohlenhydrat ABC-Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,26	49304	42 %	ja
30	Dshi_2964	Nucleosid-bindendes Protein	4,58	42246	63 %	ja
31	Dshi_2695	Aminosäure ABC-Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,3	49013	36 %	ja
32	Dshi_2695	Aminosäure ABC-Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,3	49013	33 %	ja
33	Dshi_0862	Aminosäure ABC-Transporter, periplasmatisches Substrat-Bindeprotein	4,65	40382	83 %	ja

Spot-Nr.	Genlocus	Proteinbeschreibung	pI	nominale M _r	Sequenzabdeckung	Signalpeptid
Membrantransport (ABC-Transporter)						
44	Dshi_0974	ABC-Transporter für verschiedene Polyole, periplasmatisches Bindeprotein	4,19	47453	63 %	ja
TRAP-Transporter						
1	Dshi_1195	TRAP-Transporter Solut-Rezeptor	4,3	34686	34 %	ja
16	Dshi_1087	TRAP-Transporter Solut-Rezeptor	4,71	33482	50 %	ja
17	Dshi_1087	TRAP-Transporter Solut-Rezeptor	4,71	33482	44 %	ja
18	Dshi_1443	TRAP-Transporter Solut-Rezeptor	4,51	34386	45 %	ja
19	Dshi_1443	TRAP-Transporter Solut-Rezeptor	4,51	34386	36 %	ja
35	Dshi_0645	TRAP-Typ, uncharakterisiertes Transportsystem	4,69	34796	49 %	ja
37	Dshi_1089	TRAP Dicarboxylat-Transporter-DctP Untereinheit	4,43	35380	49 %	ja
Flagellen Aufbau						
8	Dshi_3361	Flagellin	4,04	52450	39 %	nein
abbauende Enzyme						
5	Dshi_1067	Superoxid-Dismutase	4,79	22145	76 %	nein
25	Dshi_2673	Quinoprotein Alkohol Dehydrogenase	4,61	64009	56 %	ja
43	Dshi_0849	5'-Nukleotidase Domänenprotein	4,17	55752	61 %	ja
cytoplasmatische Proteine						
7	Dshi_0912	Thiazol Phosphat Synthase	4,75	27786	27 %	nein
15	Dshi_1549	Elongationsfaktor Ts	4,76	30278	70 %	nein
putative, uncharakterisierte Proteine						
3	Dshi_3093	-	4,28	20222	36 %	nein
9	Dshi_2665	Ähnlichkeit mit YVTN-β-Propeller Protein Familie	4,48	35655	38 %	ja
11	Dshi_2665	Ähnlichkeit mit YVTN-β-Propeller Protein Familie	4,48	35655	40 %	ja
39	Dshi_2635	Ähnlichkeit mit Pentapeptid Repeat Protein	4,77	25692	62 %	nein

Die erhaltenen Daten zeigen eine sehr hohe Anzahl von Transportproteinen unter den identifizierten Proteinen. Zwölf davon gehören der Familie der ABC-Transporter an, weitere fünf der Familie der TRAP-Transporter. Dieses Ergebnis steht im Einklang zu dem annotierten Genom von *D. shibae*, welches eine hohe Anzahl von Genen besitzt, die für ABC- bzw. TRAP-Transporter kodieren. Auch bei vorangegangenen Sekretomanalysen

anderer Organismen, wie *E. coli* oder dem marinen Organismus *R. pomeroyi* wurden ABC-Transporter als einer der Hauptbestandteile des Sekretoms identifiziert (Xia *et al.*, 2008; Christie-Oleza und Armengaud 2010).

Eine hohe Zahl an Transporter-kodierenden Genen bietet in nährstoffarmen Habitaten wie dem Ozean die Möglichkeit, große Mengen der in geringer Konzentration verfügbaren Nährstoffe aufzunehmen.

Im Sekretom detektiertes Flagellin rührt allem Anschein nach von freigesetztem Protein beschädigter Flagellen her. Es ist aber auch denkbar, dass es von sich im Aufbau befindlichen Flagellen stammt. Das Strukturprotein Flagellin wird bei Gram-negativen Bakterien normalerweise mittels eines spezifischen Transportmechanismus des Flagellenapparates über einen beide Membranen durchspannenden Hohlkanal aus der Zelle transportiert (Kuwayama *et al.*, 1989; Namba *et al.*, 1989) und polymerisiert dort mit weiterem Flagellin zum Flagellenfilament. Flagellin wurde in vielen Veröffentlichungen bei Sekretomanalysen identifiziert (Antelmann *et al.*, 2001; Gohar *et al.*, 2002; Gilois *et al.*, 2007) und stellt trotz fehlendem Signalpeptid keine Besonderheit im Sekretom dar.

Für *D. shibae* wurden unter den oben genannten Kultivierungsbedingungen drei degradierende Enzyme gefunden. Der Genlokus Dshi_0849 kodiert für eine 5' - Nucleotidase, ein Enzym, das für viele marine Bakterien beschrieben ist (Drapeau und MacLeod, 1963; Thompson *et al.*, 1969; Hayashi *et al.*, 1970). Es kann sowohl periplasmatisch als auch cytoplasmatisch bzw. Cytoplasmamembran-gebunden vorliegen. Dieses Enzym hydrolysiert periplasmatisch vorliegende Nukleotide, welche z.B. von lysierten Zellen stammen, zu Nukleosiden und Phosphatresten. Diese können im Anschluss in das Cytoplasma aufgenommen werden. Der dabei verfügbar werdende organische Phosphor stellt ein essentielles Element dar, welches z.B. für die Biosynthese von DNA und RNA benötigt wird.

Auch wenn anorganische Phosphorverbindungen (P_i) die bevorzugte Phosphorquelle für mikrobielles Wachstum sind, so ist es für marine Bakterien aufgrund häufiger P_i -Limitierungen in vielen Meeresregionen von Vorteil, gelösten organischen Phosphor (*dissolved organic phosphorous*, DOP) aufnehmen zu können (Karl, 2000; Wu *et al.*, 2000). DOP bildet den Großteil des Phosphorvorrates der Meere und bietet somit Bakterien, die diesen metabolisieren können, einen Wachstumsvorteil.

Der Genlokus Dshi_2673 kodiert für eine Quinoprotein Alkoholdehydrogenase. Methanoldehydrogenasen wurden für Gram-negative Methylotrophe beschrieben (Goodwin und Anthony, 1998). Dort sind sie im Periplasma lokalisiert und katalysieren die Oxidation von primären Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden. Dies dient der Energiekonservierung in der Zelle. Bei marinen Bakterien sind Quinoprotein Alkoholdehydrogenasen bislang ebenfalls nur für methylotrophe Organismen beschrieben (Waechter-Brulla *et al.*, 1993; Inagaki *et al.*, 2004; DiSpirito *et al.*, 1990).

Genlokus Dshi_1067 kodiert für eine Superoxid Dismutase (SOD), ein Metalloenzym, das Schutz gegen oxidativen Stress bietet. Dieses Enzym besitzt kein Signalpeptid. Für Bakterien sind sowohl periplasmatische als auch cytoplasmatische SOD beschrieben. Die Lokalisation in der Zelle selbst ist dabei meist abhängig von dem Kofaktor der SOD. Es ist auszuschließen, dass es sich um ein cytoplasmatisches Protein handelt, welches durch Lyse von Zellen in das Kulturmedium gelangen konnte, da die Messung der G6PD im Überstand eine Zelllyse während der Proteinisolierung ausschließt (Kap. 4.2.3.2). Außerdem müssten bei erfolgter Zelllyse weitere cytoplasmatische Proteine auf dem 2D-Gel detektierbar sein. So müssten vor allem solche Proteine, die in höherer Anzahl im Cytoplasma vorhanden sind (z.B. Chaperone), detektiert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass das Protein auf einem bisher unbekannten, alternativen Transportweg aus der Zelle befördert wurde.

Drei der identifizierten Proteine wurden als putative, uncharakterisierte Proteine klassifiziert. Das Protein, das durch den Genlocus Dshi_2665 kodiert wird, besitzt Homologie zur YVTN- β -Propeller Protein Familie. Ein anderes (Genlokus Dshi_2635) besitzt Ähnlichkeit zu einem Pentapeptid Repeat Protein (PRP). PRPs sind weit verbreitet in Bakterien. Allerdings konnte bisher nur für wenige ihre biochemische Funktion beschrieben werden. So konnte für ein PRP aus *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt werden, dass dieses Protein eine Resistenz gegenüber Gyrase-Inhibitoren vermittelt. Auch wurden mögliche Funktionen als Transporter sowie für post-translationale Modifikationen postuliert (Vetting, *et al.* 2006). Die Gensequenz, die für das dritte uncharakterisierte Protein kodiert (Genlocus Dshi_3093), weist hohe Sequenzhomologien zu Genen in anderen Genomen von Mitgliedern der *Roseobacter*-Gruppe auf. Die homologen Gene werden in der Datenbank ebenfalls als für putative, uncharakterisierte Proteine kodierend beschrieben.

Zwei der identifizierten Proteine konnten als cytoplasmatische Proteine identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die der Thiazol Biosynthese zugehörige Thiazol-Phosphat-Synthase sowie um den Elongationsfaktor Ts. Die Gene beider Proteine kodieren für kein Signalpeptid. Eine vorausgegangene partielle Zelllyse, welche diese Proteine ins Kulturmedium freigesetzt hat, kann aus oben angeführten Gründen ausgeschlossen werden. Vielmehr wurde bereits in mehreren Publikationen für Sekretomanalysen beschrieben, dass neben extrazellulären Proteinen wenige cytoplasmatische detektiert wurden (Christie-Oleza und Armengaud, 2010; Gilois *et al.*, 2007; Rosenkrands *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wurden oft Elongationsfaktoren beschrieben (Antelmann *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2007; Christie-Oleza und Armengaud, 2010; Watt *et al.*, 2005). Als häufigstes Argument wurde in diesen Publikationen ebenfalls ein noch unbekannter Transportmechanismus, der die Proteine aus dem Cytoplasma befördert, genannt.

Unter den gegebenen Wachstumsbedingungen in SW-Medium konnten einige periplasmatische Proteine von *D. shibae* identifiziert werden. Darunter befanden sich in erster Linie Transporterproteine. Insgesamt kodieren 24,6 % des *D. shibae* Genoms 1052 Gene, deren Genprodukte ein Signalpeptid tragen. Neben den Transporter-zugehörigen Proteinen kodieren viele dieser Gene für hypothetische Proteine. Für den Stamm *E. coli* K12 hingegen wurden nur 250 Proteine beschrieben, die über die innere Membran transportiert werden können. Das entspricht etwa 6 % der Proteine, die von dem gesamten Genom kodiert werden (Robinson und Bolhuis, 2004). Von dem Bakterium *B. subtilis* ist bekannt, dass es Proteine in hohen Mengen sekretiert. Hierbei wird angenommen, dass die über die Plasmamembran transportierten Proteine etwa 7 % des Proteoms darstellen (Tjalsma *et al.*, 2004). Vergleicht man diese Werte mit dem von *D. shibae*, so wird ersichtlich, dass dieses Genom ein großes Potential an Proteinen bietet, welche möglicherweise sekretiert werden. Unter den hier gewählten Kultivierungsbedingungen konnte nur ein geringer Teil Signalpeptid-tragender Proteine aus *D. shibae* detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass neben einer hohen Zelldichte, wie hier durch die Stationärphase simuliert, weitere Faktoren die Produktion extrazellulärer Proteine steigern. So ist es denkbar, dass bestimmte abbauende Enzyme nur in Anwesenheit ihrer Substrate gebildet werden, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Matsushima *et al.*, 2010; Arnosti, 2003).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in weitergehenden Versuchen *D. shibae* mit unterschiedlichen Nährstoffangeboten kultiviert und das jeweilige Sekretom analysiert.

4.2.3.4 Sekretomanalysen von *Dinoroseobacter shibae* kultiviert mit verschiedenen Nährstoffangeboten

Um ein erhöhtes Nährstoffangebot wie z.B. während einer Phytoplanktonblüte im Ozean zu simulieren, wurde *D. shibae* in dem nährstoffreichen MB-Medium kultiviert. Während des Zusammenbruchs einer solchen Algenblüte existiert im Ozean ein Überangebot an Nährstoffen für die Bakterien. Die Kultivierung, Gewinnung und Auftrennung der Proteine erfolgte analog zu der von *D. shibae* kultiviert in SW-Medium. In Abbildung 15 ist das Ergebnis der 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung dargestellt.

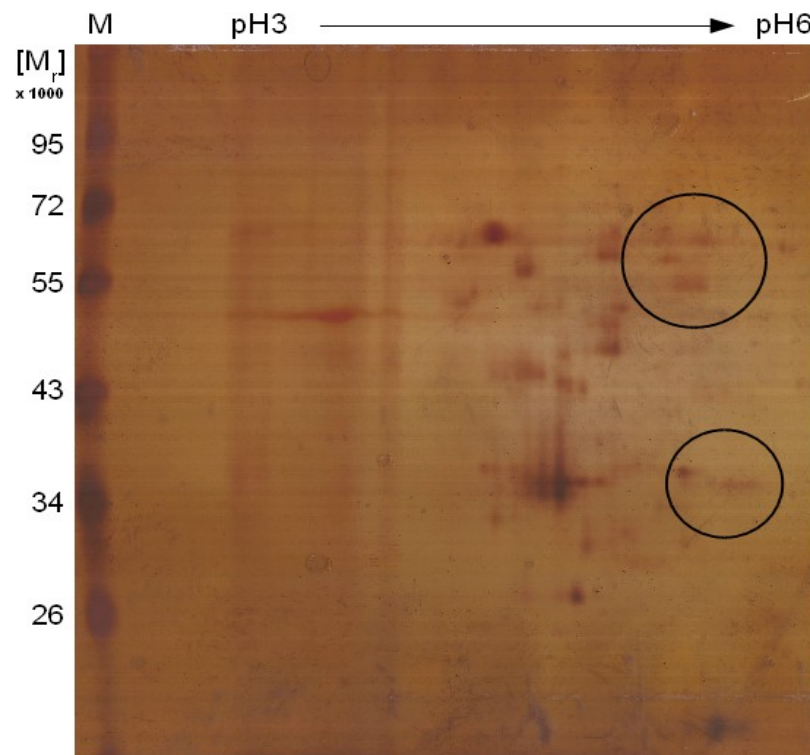


Abbildung 15: Sekretomanalyse von *D. shibae* kultiviert in MB-Medium. Dargestellt ist die Auftrennung von 100 µg eines Proteingemisches sekretierter Proteine von *D. shibae* kultiviert in MB-Medium. Oberhalb des Gelbildes ist der pH-Bereich angezeigt, über den die Proteine in der IEF separiert wurden. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1000). Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht. Mit Kreisen markiert sind Proteine-zeigende Bereiche, welche in der Sekretomanalyse von *D. shibae* kultiviert in SW-Medium nicht detektiert werden konnten.

Bei der Sekretomanalyse von *D. shibae* kultiviert in MB-Medium konnten im Vergleich zu der Kultivierung in SW-Medium möglicherweise einige zusätzliche Proteine detektiert werden. Bereiche, die mögliche zusätzliche Proteine zeigen, sind in Abbildung 15 mit einem Kreis markiert. Ob es sich hierbei um weitere sekretierte Proteine handelt und welche dies sind müsste in weiteren MALDI-TOF-Analysen untersucht werden. Generell lässt sich vermuten, dass das mit dem MB-Medium geänderte Nährstoffangebot die Sekretion zusätzlicher Proteine hervorgerufen hat.

Während der Annotation von *D. shibae* wurden Gene, die für eine Chitin-Deacetylase sowie eine Polysaccharid-Lyase kodieren, identifiziert. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um Gene handelt, die für sekretierte Enzyme kodieren, und um die automatische Annotation bestätigen zu können, erfolgte die Kultivierung von *D. shibae* außerdem in SW-Medium mit 0,1 % (w/v) Chitin und in MB-Medium mit 0,1 % (w/v) Chitin. Die Kultivierung, Gewinnung und Auftrennung der Proteine erfolgte analog zu *D. shibae* kultiviert in SW-Medium. Die 2D-Gelbilder zeigten, dass sich das Sekretom der Kultivierung von *D. shibae* in SW-Medium mit 0,1 % (w/v) Chitin und in MB-Medium mit 0,1 % (w/v) Chitin visuell nicht von den Sekretomen der Kultivierung in Chitin-freiem Medium unterschieden (Daten nicht gezeigt).

Für *D. shibae* wurde eine wirtsunspezifische Symbiose mit Algen postuliert (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Um den Einfluss dieser möglicherweise symbiotischen Beziehung auf die Proteinsekretion von *D. shibae* zu untersuchen, wurde das Sekretom von Kokultivierungen des Bakteriums mit dem Dinoflagellaten *I. galbana* untersucht. Um zwischen sekretierten Proteinen des Bakteriums und des Dinoflagellaten unterscheiden zu können, wurde das Sekretom einer reinen Dinoflagellatenkultur untersucht. Von beiden Kultivierungen standen jeweils lediglich 400 ml zellfreier Kulturüberstand zur Verfügung, aus dem die Proteine mit Ammoniumsulfat gefällt wurden. Die OD_{578nm} der Kulturen betrug hierbei 0,55. Die Aufbereitung der präzipitierten Proteine erfolgte wie zuvor beschrieben. Abbildung 16 zeigt vergleichend die 2D-Gelbilder der beiden Kultivierungen.

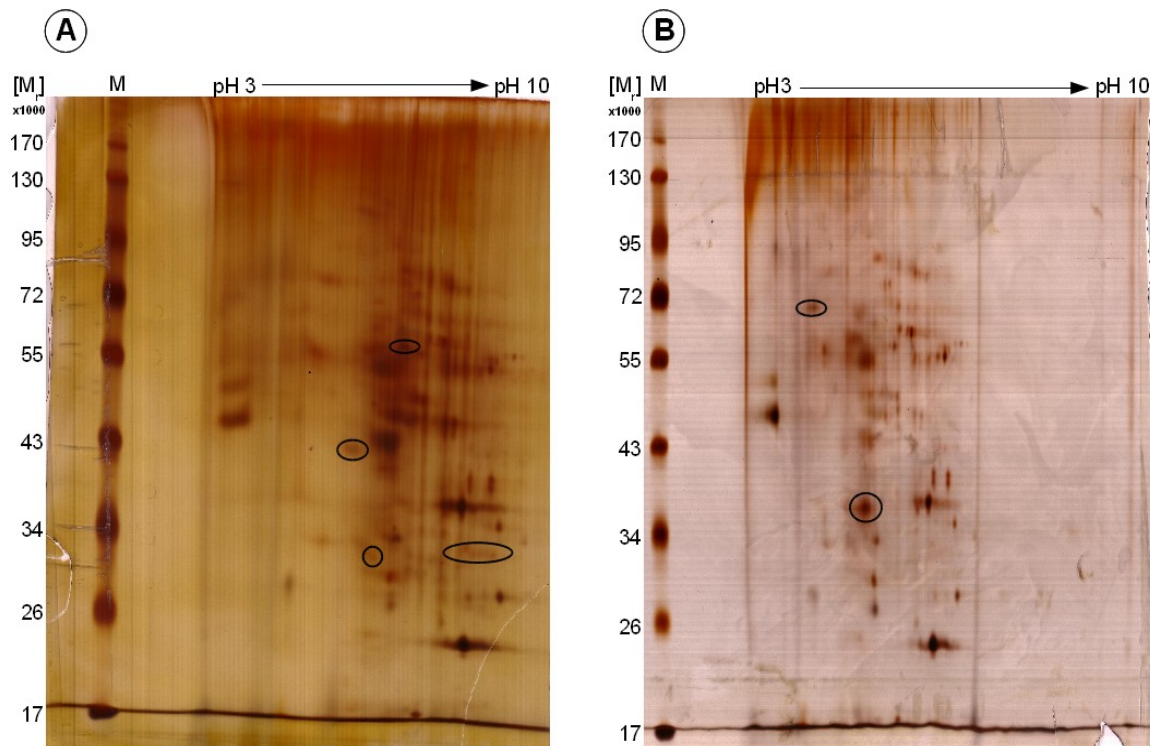


Abbildung 16: Sekretomanalyse von *D. shibae* in Kokultivierung mit dem Dinoflagellaten *I. galbana*. Im linken Bild (A) dargestellt ist die Auftrennung eines Proteingemisches sekretierter Proteine von *I. galbana*, im rechten (B) die Auftrennung sekretierter Proteine von *D. shibae* in Kokultivierung mit *I. galbana*. In schwarz eingekreist sind Proteinspots, die nur auf dem jeweiligen Gelbild detektiert werden konnten. Oberhalb des Gelbildes ist der pH-Bereich angezeigt, über den die Proteine in der IEF separiert wurden. Spur M zeigt die Trennung von Markerproteinen, deren relative molekulare Masse angegeben ist (x 1000). Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die 2D-Gel Analysen des Sekretoms der Kokultivierung von *I. galbana* und *D. shibae* zeigen ein fast identisches Proteinmuster. Auf dem jeweiligen Gel sind Proteine, die nur innerhalb dieser Kultivierung detektiert wurden, markiert (Abb. 16). Diese könnten ein Hinweis darauf sein, dass beide Organismen auf die Anwesenheit des anderen reagieren. Im Sekretom von *I. galbana* konnten drei Proteine identifiziert werden, die in Kokultivierung mit *D. shibae* nicht sekretiert wurden. Ebenso sind auf dem Gelbild des Sekretoms der Kokultivierung Proteine zu erkennen, die entweder von dem Dinoflagellaten aufgrund der Kokultivierung sekretiert wurden oder aber vom Sekretom von *D. shibae* stammen.

Die Kokultivierung von *D. shibae* mit *I. galbana* erfolgte lediglich bis zu einer optischen Dichte von $OD_{578nm} = 0,55$. Hierbei setzte sich die gemessene optische Dichte aus der Lichtabsorption von Flagellaten- und Bakterienzellen zusammen. Im Vergleich dazu betrug

die optische Dichte der vorangegangenen Kultivierungen von *D. shibae* für Sekretomanalysen etwa $OD_{578nm} = 2,0$. Auch war das zur Präzipitation sekretierter Proteine zur Verfügung stehende Volumen mit 400 ml (im Vergleich zu 2 l bei den vorangegangenen Kultivierungen) deutlich geringer. Dementsprechend wurden in dieser Sekretomanalyse der Kokultivierung wesentlich geringere Mengen sekretierten Proteins von *D. shibae* eingesetzt. Es ist daher wahrscheinlich, dass nur die quantitativ häufigsten sekretierten Proteine detektiert wurden.

In weitergehenden Versuchen müssten hierzu größere Volumina zellfreier Kulturüberstände von Kokultivierungen des Flagellaten mit *D. shibae* aufbereitet werden. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, die Kokultur länger zu kultivieren, so dass höhere optische Dichten erreicht werden können.

4.3 Der anaerobe Stoffwechsel von *Dinoroseobacter shibae* - Genexpressionsstudien

Zur Untersuchung des anaeroben Stoffwechsels von *D. shibae* DFL-12^T wurden Transkriptomanalysen mit *Dinoroseobacter shibae* DFL-12^T DNA-Microarrays (Agilent, Santa Clara, USA) durchgeführt. So sollte die Funktion von Genen, die durch ihre Annotation dem anaeroben Stoffwechsel zugeordnet wurde, experimentell bestätigt werden. Zusätzlich sollten weitere Gene identifiziert werden, die an der anaeroben Energiegewinnung beteiligt sind. Durch den Vergleich der Transkriptome von zwei unterschiedlichen anaeroben Wachstumsbedingungen (Denitrifikation und Arginin-Fermentation) jeweils mit dem Transkriptom aerob kultivierter Zellen sollte so auch die Identifizierung globaler anaerober Regulatoren ermöglicht werden. Zusätzlich sollte anhand der Transkriptomdaten ein möglicher Einfluss von Licht auf den anaeroben Stoffwechsel untersucht werden.

Hierzu wurden die Transkriptome von *D. shibae* DFL12^T unter aeroben Wachstumsbedingungen, unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen mit einem Zusatz von 25 mM Nitrat sowie unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit einem Zusatz von 10 mM Arginin bestimmt. Die Kultivierungen erfolgten jeweils unter Ausschluss von Licht sowie mit einer konstanten Beleuchtung von durchschnittlich 400 $\mu\text{mol Photonen/m}^2\cdot\text{s}$. Die Transkriptomanalysen aller gewählten Wachstumsbedingungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Auf die verwendeten 8x15K DNA-Microarrays waren je drei unterschiedliche Fragmente der Gene von *D. shibae* DFL-12^T jeweils als 60 nt langes Oligonukleotid der kodierenden Sequenz aufgebracht. Für die Hybridisierung der verwendeten Gesamtzell-RNA wurde die *Reference Design* Methode (Kerr und Churchill, 2001) angewandt, welche den Vergleich eines gewählten Zustandes mit einem Referenzzustand ermöglicht. Dazu wurde auf jedem Microarray eine gemeinsame Referenz (Gesamtzell-RNA aus der Kultivierung von *D. shibae* unter aeroben Wachstumsbedingungen) mit jeweils einem zu vergleichenden Zustand (Gesamtzell-RNA aus einer der jeweiligen anaeroben Kultivierung von *D. shibae*) hybridisiert. Um den Einfluss von Licht auf den anaeroben Stoffwechsel zu untersuchen, wurde auf einem weiteren Microarray das Transkriptom von *D. shibae* kultiviert unter

fermentativen Bedingungen und einer definierten Menge Licht mit dem Transkriptom von *D. shibae* kultiviert unter fermentativen Bedingungen und Lichtausschluss verglichen.

Durch den Vergleich von aeroben und anaeroben Transkriptomen wurden Gene bestimmt, die unter der jeweiligen anaeroben Wachstumsbedingung in ihrer Expression signifikant gegenüber dem aeroben Wachstum verändert waren. Durch den Vergleich der unter fermentativen Bedingungen mit Arginin kultivierten *D. shibae* Zellen mit und ohne Licht, wurden Gene bestimmt, die unter Lichtausschluss in ihrer Expression signifikant gegenüber dem Wachstum mit einer definierten Menge Licht verändert waren.

Als Maß der Signifikanz diente hierzu der natürliche Logarithmus (\ln) des *Fold Change* (FC). Der FC gab dabei an, um welchen Faktor ein Gen unter der jeweiligen anaeroben Wachstumsbedingung stärker oder schwächer exprimiert wurde, als unter aeroben Wachstumsbedingungen.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit ein Grenzwert des \ln FC von $\pm 1,4$ festgelegt, was einer Änderung der Genexpression um den Faktor 2,6 entsprach. In einigen Fällen wurden auch Gene berücksichtigt, deren \ln FC sich unter diesem Grenzwert befand. Hierbei standen die von diesen Genen kodierte Proteine in Hinblick auf ihre Funktion jedoch stets in Kontext mit signifikant regulierten Genen. Dabei wurde berücksichtigt, dass der \ln FC dieser Gene niemals weniger als 1,0 betrug, was immer noch eine zweifache Änderung der Expression bedeutete.

Die ausführlichen Daten der Auswertung der Microarray-Analysen können den Tabellen im Anhang entnommen werden. Tabelle A-1 zeigt die Daten der Transkriptomanalyse für das Wachstum unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat unter Lichtausschluss im Vergleich zu dem aeroben Wachstum unter Lichtausschluss. In Tabelle A-2 finden sich die Daten für das Wachstum unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat mit einer definierten Lichtmenge im Vergleich zu dem aeroben Wachstum mit einer definierten Lichtmenge. Tabelle A-3 gibt die Daten für das Wachstum unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin unter Lichtausschluss im Vergleich zu dem aeroben Wachstum unter Lichtausschluss wieder. Tabelle A-4 zeigt die Daten für das Wachstum unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin mit einer definierten Lichtmenge im Vergleich zu dem aeroben Wachstum mit einer definierten Lichtmenge. Schließlich gibt Tabelle A-5 die Daten für das Wachstum unter fermentativen Bedingungen

mit 10 mM Arginin unter Lichtausschluss im direkten Vergleich zu dem Wachstum unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin mit einer definierten Lichtmenge wieder.

4.3.1 Genexpression von *D. shibae* kultiviert unter anaeroben denitrifizierenden Bedingungen

4.3.1.1 Übersicht

Unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat und Ausschluss von Licht wurden 76 Gene signifikant stärker exprimiert als unter aeroben Bedingungen. Von diesen kodierten 20 Gene für hypothetische Proteine. Zudem wurden unter diesen Bedingungen 126 Gene signifikant schwächer exprimiert als unter aeroben Bedingungen. Hiervon kodierten 17 Gene für hypothetische Proteine (Tab. A-1). Abzüglich dieser konnten den Genen der übrigen Transkripte verschiedene physiologische Funktionen wie Denitrifikation, Arginin-Fermentation, Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus, Transport, Stressantwort, Regulation, Polyhydroxybutyrat (PHB)-Synthese, Motilität und Chemotaxis, Translation, Elektronentransport sowie Typ IV-Pilus/Sekretion zugeordnet werden. Weitere Transkripte, deren Gene nicht den oben genannten physiologischen Funktionen zugeordnet werden konnten, wurden unter „Sonstige“ zusammengefasst (Tab. A-1). In den Diagrammen der Abbildung 17 ist dargestellt, welche Anzahl der Genprodukte signifikant stärker exprimierten Gene bzw. der signifikant schwächer exprimierten Gene der jeweiligen physiologischen Funktion zugeordnet wurde.

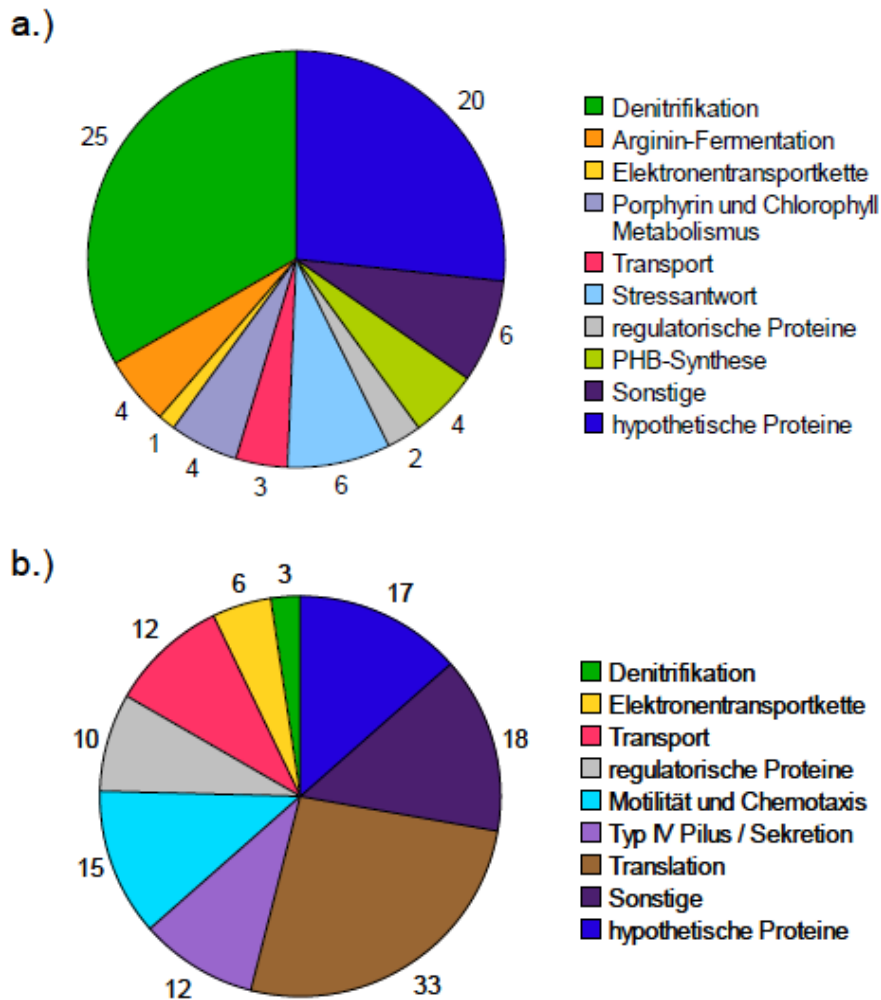


Abbildung 17: Physiologische Einteilung der Genprodukte differentiell exprimierter Gene von *D. shibae* kultiviert mit 25 mM Nitrat unter Lichtausschluss im Vergleich zu aerobem Wachstum unter Lichtausschluss. Dargestellt ist die jeweilige physiologische Funktion der Produkte differentiell exprimierter Gene, sowie deren Anzahl. a.) Gene deren Expression signifikant induziert war. b.) Gene deren Expression signifikant reprimiert war.

4.3.1.2 Gene der Denitrifikation werden stark induziert

Gene, die für Proteine der Denitrifikation kodieren, bildeten mit 40 % der Gesamtanzahl induzierter Gene die größte Gruppe mit physiologischer Funktion (Abb. 17). Zusätzlich zeigte ein Großteil dieser Gene die stärkste Regulation.

Während die Gencluster, die für die Nitritreduktase, die Stickstoffmonoxid-Reduktase sowie die Distickstoffmonoxid-Reduktase kodieren unter denitrifizierenden Bedingungen signifikant stärker exprimiert wurden, war dies für die Gene, welche für eine funktionelle periplasmatische Nitratreduktase kodieren, nicht der Fall. Diese Gene sind innerhalb des *napFDAGHBC*-Clusters organisiert. Hierbei kodiert *napA* für die große katalytische Unter-

einheit der Nitratreduktase, welche ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum sowie einen Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD)-Kofaktor enthält (Olmo-Mira *et al.*, 2004). Die kleine Unter-einheit der Nitratreduktase wird von dem Gen *napB* kodiert und ist ein Dihäm-Cytochrom *c* (Zumft, 1997). Die Genprodukte bilden zusammen ein periplasmatisches Heterodimer, welches über ein membrangebundenes Tetrahäm-Cytochrom *c* (NapC) Elektronen aus einem Quinolpool erhält. Das von *napF* kodierte Protein ist möglicherweise in den Zusammenbau des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums der katalytischen Untereinheit NapA involviert. Für das von *napD* kodierte cytoplasmatische Protein wird eine Beteiligung an der Maturation der Nitratreduktase vermutet (Olmo-Mira *et al.*, 2004). Die Funktionen von NapG und NapH sind nicht genau bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass sie in den Elektronentransfer involviert sind (Potter *et al.*, 2001).

Lediglich drei Gene des *napFDAGHBC*-Clusters konnten in der Transkriptionsanalyse reguliert vorgefunden werden, *napA*, *napD* und *napF*. Diese Gene waren jedoch in ihrer Expression durchschnittlich um den Faktor 3,2 reprimiert. Die Annahme, dass das sich in dem Wachstumsmedium befindliche Nitrat bereits durch die vorangegangene Kultivierung der Bakterien verbraucht wurde, konnte durch die Bestimmung des Nitratgehaltes des Mediums bestätigt werden. Betrug die NO_3^- -Konzentration zu Beginn der Kultivierung noch 1,55 g/l, so war sie zu dem Zeitpunkt der Probennahme bereits auf einen Wert von 7 mg/l reduziert. Es wäre möglich, dass ein Nitrat-detektierender Regulator die Expression des *napFDAGHBC*-Clusters aufgrund eines mangelnden Angebotes des terminalem Elektronenakzeptors Nitrat reprimiert. In *P. aeruginosa* wird die Expression des *narK1K2GHJI*-Operons, welches für die membrangebundene Nitratreduktase und einen Nitrattransporter kodiert, über das Zwei-Komponentensystem NarXL reguliert (Schobert und Tielen, 2010). Für NarX und NarL kodierende Gene konnten in der Annotation von *D. shibae* DFL-12^T nicht identifiziert werden. Jedoch weist die Repression der Nitratreduktase auf eine Nitrat-abhängige Regulation hin. Es wäre somit möglich, dass anstelle von NarXL ein anderes, bisher unbekanntes Regulationssystem über das Signal Nitrat die Transkription von Genen des *nap*-Clusters reguliert.

Das Gen *nirS*, welches für die Nitritreduktase kodiert, war unter diesen Bedingungen mit einer 21,6-fachen Induktion das am stärksten differentiell exprimierte Gen. Für die anderen Gene des *nirSECFDGHJN-cbiX-nnrU*-Clusters betrug der Induktionsfaktor der Expression

unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen mit 25 mM Nitrat durchschnittlich 5,3. Das *nirSECFDGHJN-cbiX-nnrU*-Cluster kodiert neben der Nitritreduktase NirS auch für alle weiteren Proteine (NirECFDGHJN), welche für die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid benötigt werden. Zusätzlich enthält dieses Cluster das Gen *nnrU*, welches für ein Protein kodiert, das an der Reduktion von Stickstoffmonoxid zu Distickstoffmonoxid beteiligt ist. Die genaue Funktion dieses Proteins ist unbekannt. Für den Stamm *R. sphaeroides* 2.4.3. wurde jedoch gezeigt, dass NnrU in die Induktion der Expression von *nirS* und Genen des *nor*-Operons involviert ist (Bartnikas *et al.*, 1997). Das ebenfalls in diesem Operon lokalisierte Gen *cbiX* kodiert für eine ATP-unabhängige Cobalt-Chelatase, die an der anaeroben Cobalamin-Biosynthese beteiligt ist. Die Lokalisation dieses Genes in dem *nirSECFDGHJN-cbiX-nnrU*-Cluster ist hierbei jedoch ungewöhnlich. Datenbankanalysen mittels IMG und pBLAST zeigten, dass das Gen *cbiX* aus *D. shibae* keine Homologie zu bekannten *cbiX*-Genen aus anderen Organismen wie z.B. *Bacillus megaterium* oder *Salmonella typhimurium* besitzt. Des weiteren wurde der Genlocus Dshi_0171 ebenfalls als *cbiX* annotiert. Dessen Genprodukt zeichnet sich sowohl durch Homologien von etwa 34 % zu CbiX aus *B. megaterium* DSM319, als auch durch die Lokalisation in einem für die Cobalamin-Biosynthese typischen Cluster aus. Es wäre somit möglich, dass die automatische Annotierung nicht korrekt war, und es sich bei dem als *cbiX* annotierten Genlokus Dshi_3171 aus dem *nirSECFDGHJN-cbiX-nnrU*-Operon um eine andere Art von Chelatase handelt. Möglich wäre, dass es sich hierbei um eine Ferrochelataase handelt, welche mit dem Einbau eines Eisenatoms in Porphyrindion d_I den letzten Schritt in der Häm d_I Biosynthese durchführt. Häm d_I ist eine der prosthetischen Gruppen der Nitritreduktase. Die Gene *nirEFDGHJ* kodieren für Proteine der Häm d_I Biosynthese. Die Lokalisation eines Genes einer solchen Ferrochelataase in diesem Gencluster wäre, bezogen auf die Organisation der Gene, daher schlüssig.

Auch die für die Stickstoffmonoxid-Reduktase kodierenden Gene des *norCBQDEF*-Operons waren im Vergleich zu aeroben Bedingungen stärker exprimiert. Die Expression der beiden strukturellen Gene *norC* und *norB*, welche für die Untereinheiten der Cytochrom *c* abhängigen Stickstoffmonoxid-Reduktase kodieren, war um den Faktor 14,1 bzw. 12,6 erhöht. Ähnlich stark reguliert war die Expression der beiden Gene *norQ* und *norD*, mit einer 10,0- bzw. 12,6-fachen Induktion der Expression. Die Genprodukte NorQ

und NorD sind an der Expression von NirS sowie NorCB beteiligt. Eine genaue Funktion ist bisher allerdings nicht bekannt. NorQ besitzt ein ATP-Bindemotiv, NorD eine Metallbindedomäne. Es wurde vermutet, dass diese beiden Proteine in die Insertion eines Metallions in die Häm-Gruppen des Cytochrom *c* involviert sein könnten (Shapleigh, 2009). In *Pseudomonas stutzeri* führte die Inaktivierung eines *norQ*-Homologs zur Bildung eines inaktiven Nor-Komplexes (Jungst und Zumft, 1992). Die Gene *norE* sowie *norF* des *norCBQDEF*-Operons waren ebenfalls signifikant in ihrer Expression verstärkt. Jedoch waren diese mit einem Faktor von 2,9 bzw. 2,6 weniger stark induziert als die anderen in diesem Operon enthaltenen Gene. Diese beiden Gene kodieren für Proteine, für die beschrieben wurde, dass sie die Aktivität der Nitritreduktase sowie der Stickstoffmonoxid-Reduktase erhöhen (de Boer *et al.*, 1996; Hartsock und Shapleigh, 2010). Ebenfalls in diesem Gencluster, den Genen *norCBQDEF* vorgelagert, befinden sich die Gene *nosR* sowie *nnrS*, deren Expression um den Faktor 3,2 bzw. 3,7 induziert wurde. Das Genprodukt NosR wurde als transkriptioneller Regulator der Distickstoffmonoxid-Reduktase beschrieben (Cuypers *et al.*, 1992; Wunsch und Zumft, 2005). Das Gen *nnrS* kodiert für ein Häm- und Kupfer-enhaltendes Membranprotein, welches in die anaerobe Atmung via Stickstoffoxiden involviert ist. Eine Inaktivierung von *nnrS* in *R. sphaeroides* hatte keine Auswirkungen auf den NO-Metabolismus oder die Expression der dafür benötigten Gene. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Inaktivierung die Taxis des Bakteriums gegenüber NO_3^- und NO_2^- beeinflusst (Bartnikas *et al.*, 2002). In *R. sphaeroides* ist die Expression von *nnrS* von dem transkriptionellen Regulator NnrR abhängig. Dieser reguliert zusätzlich auch die Expression von Genen, welche für die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid benötigt werden. Ein für NnrR kodierendes Gen konnte im Genom von *D. shibae* nicht identifiziert werden. Die Suche nach einem funktionellen Homolog zu NnrR könnte z.B. mit Hilfe einer Transposonbank durchgeführt werden.

Ebenfalls signifikant induziert war die Expression der sich im *nos*-Cluster befindlichen Gene. Das für Denitrifizierer am stärksten konservierte Genmuster des *nos*-Clusters lautet *nosRZDFYL*. In einigen denitrifizierenden Bakterien folgt in diesem Cluster ein *nosX*-Gen (Zumft, 2005). Diese Anordnung (*nosRZDFYLX*) findet sich auch in dem Genom von *D. shibae*. Das Gen *nosZ* kodiert für die Distickstoffmonoxid-Reduktase, ein

homodimeres, Kupfer-enthaltendes Protein (Zumft, 2005). Während die Transkription von *nosZ* um den Faktor 9,1 deutlich erhöht war, waren die für Proteine der NosZ-Biosynthese kodierenden Gene *nosDFY* (kodiert für den ABC-Transporter-Komplex) und *nosL* (kodiert für ein periplasmatisches Kupfer-Chaperon) mit einem Faktor von durchschnittlich 2,5 in ihrer Expression deutlich geringer induziert. Auch *nosX* und *nosR*, welche in die Aktivität von NosZ involviert sind, waren mit einem Faktor von 2,3 und 3,3 induziert, jedoch geringer als *nosZ*.

Das *nos*-Cluster enthält neben den Genen, welche für die Distickstoffmonoxid-Reduktase kodieren, zwei weitere Gene mit den Loci Dshi_3191 und Dshi_3192. Der Genlocus Dshi_3192 kodiert für ein hypothetisches Protein, welches kaum Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Organismen zeigt. Der Genlocus Dshi_3191 kodiert für einen transkriptionellen Regulator aus der Crp-Fnr-Familie und wurde in der Annotation als Dnr-Faktor (dissimilatorischer Nitratrespirationsregulator) identifiziert. Es wird vermutet, dass während der Denitrifikation entstehendes Stickstoffmonoxid ein Signal für Dnr darstellt, welches daraufhin die Transkription von *nosR* initiiert. NosR wiederum aktiviert die Expression von *nosZ* und *nosD*, was zur der Maturation der Distickstoffmonoxid-Reduktase führt (Zumft, 2005). Gene, die für Dnr-Faktoren kodieren, wurden mittels Sequenzierung in den Arten *P. aeruginosa*, *Paracoccus denitrificans*, *R. sphaeroides* und *P. stutzeri* dem *nor*-Operon nachgelagert identifiziert (Korner *et al.*, 2003). Dies entspricht auch der Lage des Locus Dshi_3191, welcher als *dnr* annotiert wurde. Zusätzlich befindet sich dem *nor*-Cluster nachfolgend ein weiteres Gen, welches laut Annotation für das Dnr-Homolog DnrD kodiert (Dshi_3189). Während *dnrD* um den Faktor 2,0 induziert vorlag, war die Expression des Genes *dnr* um den Faktor 4,3 erhöht. Eine durch homologe Rekombination generierte *D. shibae dnrD*-Deletionsmutante resultierte in einem geringfügig schwächeren anaeroben Wachstum verglichen mit dem Wildtypen (persönliche Mitteilung Andreas Raschka). Welche genauere regulatorische Funktion die Produkte der beiden Gene in der Denitrifikation haben, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Neben den klassischen Genen der Denitrifikation wurden zusätzlich zwei Gene signifikant induziert gefunden, deren Produkte eine regulatorische Funktion bei der Antwort der Zelle auf oxidativen Stress besitzen könnten. Der Genlocus Dshi_2303 kodiert für ein Protein, welches zu der NnrS-Familie gehört und wurde 2,6-fach induziert vorgefunden. Ein

ebensolches Gen wurde bereits für das *nor*-Gencluster beschrieben (s.o.). Der Genlocus Dshi_2304 wurde mit einer 4,2-fachen Induktion vorgefunden. Das durch ihn kodierte Protein wird DnrN bezeichnet. DnrN ist ein Protein, welches möglicherweise für die Reparatur von Eisen-Schwefel-Clustern nach nitrosativer Schädigung benötigt wird (Heurlier *et al.*, 2008).

Ein in der Annotation beschriebenes Gen, das für den globalen Regulator der Fumarat- und Nitratreduktion (Fnr) kodiert, und beispielsweise die Expression der Dnr-Regulatoren kontrolliert, konnte mit Hilfe der Transkriptomanalysen nicht identifiziert werden. Allerdings wurden von den 31 Genen mit vorhergesagter Fnr-Bindestelle zehn unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen signifikant induziert vorgefunden, unter ihnen auch der Regulator DnrD (Tab. A-1). In *E. coli* reguliert Fnr die Expression einer Vielzahl von Genen unterschiedlicher Funktion. Darunter befinden sich beispielsweise Gene für Alkoholdehydrogenasen, C4-Dicarboxylat Transporter, Cytochrom *d*- und *o*-Typ Oxidasen, Dimethylsulfoxid-Reduktasen, Nitrat- und Nitritreduktasen und NADH- und Succinat-Dehydrogenasen (Korner *et al.*, 2003). Fnr liegt unter anaeroben Bedingungen als aktives Homodimer vor, wobei jedes der Monomere ein $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum zur Detektion von Sauerstoff enthält (Lazazzera *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1996). Unter aeroben Bedingungen zerfallen die $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren zu $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentren und das aktive Fnr-Dimer liegt in seinen inaktiven Monomeren vor (Khoroshilova *et al.*, 1997; Popescu *et al.*, 1998). Während in *B. subtilis* die Expression von *fnr* unter Anaerobiose stark aktiviert ist, ist sie unter diesen Bedingungen in *E. coli* leicht reprimiert (Cruz Ramos *et al.*, 1995). Für *E. coli* konnte außerdem gezeigt werden, dass das Bakterium unter aeroben und anaeroben Bedingungen eine ähnlich hohe Konzentrationen an Fnr enthält (Unden und Schirawski, 1997; Sutton *et al.*, 2004). Es ist somit denkbar, dass der Regulator Fnr in der Transkriptomanalyse in seiner Expression nicht stärker induziert gefunden wurde, da das kodierende Gen konstitutiv exprimiert wird. Einen Einfluss des als *fnr* annotierten Genes auf die Anaerobiose von *D. shibae* sollte in weiteren Versuchen mit Hilfe einer Deletionsmutante untersucht werden.

4.3.1.3 Gene der Arginin-Fermentation werden induziert

Die Gene, welche für die drei Enzyme der Arginin-Fermentation kodieren, wurden unter denitrifizierenden Bedingungen signifikant induziert gefunden. Hierbei war die Expression

des für die Arginin-Deiminase kodierenden Genes *arcA* um den Faktor 5,8 am stärksten induziert. Das für die katabolische Ornithin-Carbamoyl-Transferase kodierende Gen *arcB* sowie das für die Carbamat-Kinase kodierende Gen *arcC* wurden mit einem Faktor von 4,4 und 3,1 ebenfalls deutlich induziert vorgefunden. Zusätzlich in dem Gencluster lokalisiert ist das den drei Genen vorgeschaltete *arcD*, welches für einen Arginin-Ornithin-Antiporter kodiert. Die Expression dieses Genes war um das 3,7-fache induziert. Die Expression von Genen, die für Proteine der Arginin-Fermentation kodieren wurde unter denitrifizierenden Bedingungen bereits beobachtet (Schobert und Tielen, 2010). Für *P. aeruginosa* wurde beschrieben, dass die Expression des *arcDABC*-Operons von dem transkriptionellen Regulator Anr abhängig ist (Galimand *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1999). Anr ist ein Homolog von Fnr aus der Crp-Fnr-Familie transkriptioneller Regulatoren. Da Fnr ebenfalls die Transkription einiger Denitrifikationsgene reguliert, ist die Expressionsinduktion des *arcDABC*-Operons unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen in *D. shibae* ebenfalls nachvollziehbar.

4.3.1.4 Differentielle Expression von Genen anderer Elektronentransportketten-Enzyme

Verschiedene Gene, die für Proteine der Elektronentransportkette kodieren, waren unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen reprimiert. So waren zwei Pyrrolochinolinchinon (PQQ)-abhängige Alkoholdehydrogenasen in ihrer Genexpression um den Faktor 5,0 bzw. 12,8 herabgesetzt. PQQ-abhängige Alkoholdehydrogenasen oxidieren Alkohole. Dabei entstehende Reduktionsäquivalente werden auf die Elektronentransportkette übertragen (Rupp und Gorisch, 1988). Gleiches gilt für ein um den Faktor 2,6 reprimiertes Gen, welches für das Enzym L-Lactat Dehydrogenase kodiert. Unter anaeroben Bedingungen katalysiert dieses Enzym die Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Neben der geringen Energieausbeute der Pyruvatreduktion spricht auch das Nichtvorhandensein ihrer Substrate für die Repression der für sie kodierenden Gene. Ebenfalls reprimiert war die Expression von Genen, die für Cytochrom *c* kodieren. Cytochrome dienen als Elektronenüberträger in den verschiedenen Elektronentransportketten. Die reprimierten Gene kodieren vermutlich für Cytochrome der aeroben Atmung bzw. für Elektronentransportketten, die unter gegebenen Wachstumsbedingungen nicht genutzt werden. Im Gegensatz dazu war die Expression zweier Gene, die ebenfalls für Cytochrom *c* kodieren, signifikant induziert (Faktor 2,0 bzw. 3,0). Eines dieser beiden Gene (Dshi_3276) besitzt eine Fnr-Bindestelle.

Anhand ihrer Position im Genom lässt sich jedoch kein Rückschluss auf die Elektronentransportkette ziehen, zu der die von ihnen kodierten Proteine gehören.

4.3.1.5 Gene des Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus werden induziert

Unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen wurden für die Kofaktor-Biosynthese kodierende Gene signifikant induziert gefunden. Das Gen *hemA* war um den Faktor 7,0 induziert, die Gene *hemN1* um den Faktor 3,0 und *hemN2* um den Faktor 2,1. Die Promotoren dieser Gene tragen eine Fnr-Bindestelle und sind an der Biosynthese von Häm beteiligt. Das Gen *hemA* kodiert für das initiale Enzym der Häm-Biosynthese, die 5-Aminolävulinsäure-Synthase. Die Gene *hemN1* und *hemN2* hingegen kodieren für ein Protein der fortgeschrittenen Häm-Biosynthese, die Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen III Dehydrogenase. Häm dient für einige Enzyme des anaeroben Stoffwechsels, z.B. für die Nitratreduktase (Häm *c*), die Nitritreduktase (Häm *c*), die Stickstoffmonoxid-Reduktase (Häm *b*) oder den transkriptionellen Regulator Dnr, als prosthetische Gruppe,.

Ebenfalls induziert exprimiert wurden zwei Gene, die für die Untereinheiten eines Cobalt-Transporters kodieren, *cbtA* (3,2-fach induziert) und *cbtB* (2,6-fach induziert). Dieser Transporter ist in die Cobalamin-Biosynthese involviert, dessen Produkt Cobalamin ein Cobaltatom enthält. Cobalamin dient für eine Vielzahl von Enzymen als Cofaktor, wie Isomerasen, Methyltransferasen und Dehalogenasen (Banerjee und Ragsdale, 2003) und wird außerdem für die Bacteriochlorophyll Biosynthese benötigt. Gene, die für Proteine des Photosynthese-Apparates kodieren, wurden unter denitrifizierenden Bedingungen in ihrer Expression induziert vorgefunden (Tab. A-1). Die Expressionsinduktion lag hierbei unter der definierten Signifikanzgrenze einer 2,6-fachen Regulation (2,0 bis 2,5-fach induziert). Auf den Aspekt der Photosynthese wird in Kapitel 4.3.5 ausführlicher eingegangen.

4.3.1.6 Gene für Transportproteine

Die Expression von Genen, die für Proteine von Zucker- und Aminosäuretransportern kodieren, war unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen signifikant reprimiert. Der Repressionsfaktor lag hierbei je nach Gen zwischen 2,6 und 7,8. Ebenfalls in ihrer Expression reprimiert waren einige Gene, welche für die Untereinheiten von C4-Dicarboxylat TRAP-Transportern kodieren. Hierbei bildet das periplasmatische Solut-

Rezeptorprotein DctP zusammen mit den integralen Membranproteinen DctQ und DctM einen funktionellen Transporterkomplex, welcher von der Zelle für die Aufnahme von C4-Dicarboxylaten als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet wird.

Für *E. coli* wurde beschrieben, dass dieser Organismus C4-Dicarboxylate sowohl für den aeroben als auch für den anaeroben Stoffwechsel zur Energiegewinnung verwenden kann. Unter aeroben Bedingungen können z.B. Succinat, Fumarat oder Malat im Citratzyklus zu CO₂ oxidiert werden. Die Aufnahme der C4-Dicarboxylate erfolgt hierbei über den während des anaeroben Wachstums gebildeten Carrier DctA (Six *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1999). Unter anaeroben Bedingungen erfolgt die Energiegewinnung über die Fumarat-atmung, bei der C4-Dicarboxylate wie Fumarat, Malat oder Aspartat für die Reduktion zu Succinat verwendet werden. Der anaerobe Transport von C4-Dicarboxylaten erfolgt über den DcuB-Carrier, welcher unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von C4-Dicarboxylaten gebildet wird (Kim *et al.*, 2009; Zientz *et al.*, 1998). Dieser Carrier stellt einen Fumarat/Succinat-Antiporter dar, der Succinat, welches nicht als Energiequelle genutzt werden kann, im Austausch mit Fumarat, Malat oder Aspartat aus der Zelle transportiert (Janausch *et al.*, 2002). Die in dem Transkriptom von *D. shibae* unter denitrifizierenden Bedingungen und Lichtausschluss für C4-Dicarboxylat TRAP-Transporter kodierenden Gene waren meist in ihrer Expression reprimiert (Tab. A-1). Dies ist ein Hinweis darauf, dass deren Genprodukte unter aeroben Bedingungen für den Transport von C4-Dicarboxylaten verwendet werden könnten. Weiterhin lagen unter denitrifizierenden Bedingungen Gene, welche ebenfalls für einen C4-Dicarboxylat TRAP-Transporter kodieren, in ihrer Expression induziert vor (Dshi_3153 bis Dshi_3155). Außer Succinat als Kohlenstoff-Quelle lag kein C4-Dicarboxylat im Medium vor, welches der Energiegewinnung dienen könnte. Demnach wäre es möglich, dass dieser Transporter ausschließlich für die Aufnahme der Kohlenstoff-Quelle verwendet wird. Ob der Transporter ausschließlich unter anaeroben Bedingungen synthetisiert, oder anaerob lediglich vermehrt synthetisiert wird (um z.B. ausreichend vorliegendes Succinat in den Speicherstoff PHB zu überführen; siehe PHB-Synthese), lässt sich anhand der Daten nicht sagen.

Die Expression eines Genes, das für das periplasmatische Bindeprotein eines Nitrat-Transporters kodiert, war mit einem Faktor von 2,9 ebenfalls induziert. Dies stimmt mit

der Beobachtung überein, dass ein Großteil der für die Enzyme der Denitrifikation kodierenden Gene induziert ist. Durch den Transport von Nitrat in die Zelle soll so der Prozess der Denitrifikation aufrecht erhalten werden. Im Promotor des für den Nitrat-Transporter kodierenden Genes befindet sich außerdem eine Bindestelle für den Sauerstoffsensitiven Regulator Fnr.

4.3.1.7 Gene der allgemeinen Stressantwort werden induziert

Unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen war die Genexpression von verschiedenen Proteinen der zellulären Stressantwort signifikant induziert. Das Genom von *D. shibae* besitzt insgesamt elf über das gesamte Chromosom verteilte Gene, die für Proteine kodieren, welche der „universelles Stress-Protein“ (Usp)-Familie angehören. Drei dieser Gene waren unter den gegebenen Wachstumsbedingungen in ihrer Expression durchschnittlich um den Faktor 2,7 induziert. Für zwei der drei regulierten Gene wurde eine Fnr-Bindestelle in ihrem Promotor postuliert (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Für *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass die Proteine UspK und UspN wesentlich zum anaeroben Langzeitüberleben sowie dem Überleben in der anaeroben Stationärphase beitragen. Die Expression der beiden kodierenden Gene wird hierbei über das Fnr-Homolog Anr kontrolliert (Schreiber *et al.*, 2006; Boes *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden für *P. aeruginosa* drei weitere Proteine der Usp-Familie als Anr-kontrolliert beschrieben (Boes *et al.*, 2008).

Ebenfalls signifikant mit einem Faktor zwischen 2,3 und 6,8 waren drei Hitzeschockproteine Hsp20 induziert. Solche Proteine können als Chaperone wirken, welche andere Proteine vor Denaturierung oder Aggregation schützen und deren korrekte Konformationsbildung unterstützen. Sie werden bei Hitze oder einer anderen Form von Umweltstress induziert (Lindquist und Craig, 1988). Die Expressionsinduktion der für Hitzeschockproteine kodierenden Gene unter limitierten Sauerstoffbedingungen wurde bereits für *B. subtilis* beschrieben (Hecker *et al.*, 1996).

Desweiteren induziert vorgefunden wurden ein für ein Kälteschockprotein kodierendes Gen sowie ein Gen, das für das Protein OmpW (*outer membrane protein*) kodiert. Letzteres gehört zur Familie der Außenmembranproteine, welche in Gram-negativen Bakterien weit verbreitet ist. Die Funktion der Omp ist nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass sie in den Schutz der Zelle vor verschiedenen Arten von Umweltstress

involviert sind (Hong *et al.*, 2006). Interessanterweise besitzt der Promotor des für OmpW kodierenden Genes aus *D. shibae* DFL-12^T eine Fnr-Bindestelle.

4.3.1.8 Gene für regulatorische Proteine

Das Transkriptom zeigte mehrere signifikant induzierte und reprimierte Gene, die für regulatorische Proteine kodieren. Induziert vorgefunden wurde z.B. die Expression eines Genes, welches für ein Protein der TraR/DksA Familie kodiert. Die Expression war hierbei um den Faktor 3,8 induziert. Für Proteine der TraR/DksA Familie wurde beschrieben, dass sie einen Einfluss auf die Transkriptionskinetik ausüben, was beispielsweise in der Abschwächung der ribosomalen RNA-Synthese und der Aktivierung der Expression verschiedener Transportergene während Nährstoffmangel-bedingtem Stress resultiert (Blankschien *et al.*, 2009). In dem hier untersuchten Transkriptom war eine Vielzahl von Genen, welche für ribosomale RNA kodieren, signifikant reprimiert, was sich mit der induzierten Expression des für ein Protein der TraR/DksA Familie kodierenden Genes erklären ließe.

Im Gegensatz dazu war beispielsweise die Expression eines für einen Regulator der MarR-Familie (*multiple antibiotic resistance regulator*) kodierenden Genes um den Faktor 5,2 reprimiert. Mar-Proteine sind in die Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika involviert und unterliegen der Kontrolle ihres Repressors MarR. Ebenfalls in ihrer Expression reprimiert waren drei für Proteine der LuxR-Familie kodierende Gene. LuxR-Regulatoren sind häufig Aktivatoren des Quorum Sensing, ein Mechanismus zur Kontrolle der Expression von Virulenzfaktoren und der Biofilmentwicklung (Bassler, 1999). Des weiteren wurden Gene, die für Proteine von regulatorischen Zwei-Komponentensystemen kodieren, in ihrer Expression reprimiert vorgefunden. So z.B. ein für CtrA kodierendes Gen (Repressionsfaktor 8,5). Für *Caulobacter crescentus* wurde beschrieben, dass CtrA in eine Vielzahl regulatorischer Prozesse, unter anderem in die Biogenese von Flagellen und Pili, involviert ist (Skerker und Shapiro, 2000; Quon *et al.*, 1996). Da für Flagellen- und Pili-Ausbildung kodierende Gene in dem hier untersuchten Transkriptom von *D. shibae* DFL-12^T ebenfalls reprimiert vorgefunden wurden, könnte CtrA in diese Repression involviert sein.

4.3.1.9 Gene für Motilität und Chemotaxis werden reprimiert

Siebenundzwanzig Gene, die für Proteine der bakteriellen Chemotaxis und des Flagellen-

aufbaus kodieren, konnten in dem Transkriptom als signifikant reprimiert vorgefunden werden. Die Expression war hierbei um einen Faktor zwischen 2,1 und 6,6 reprimiert. Bakterien bilden Flagellen, um auf externe Stimuli reagieren zu können und so z.B. nährstoffreiche Umgebungen zu erreichen oder Nachteil bringenden Umweltreizen zu entfliehen. Unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen nutzt *D. shibae* Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor. Hierbei wird ausreichend Energie für das Wachstum des Bakteriums generiert, welches im Vergleich zu dem Wachstum unter aeroben Bedingungen jedoch verlangsamt ist. Demzufolge bestünde keine Notwendigkeit zur Ausbildung und Nutzung von Flagellen, um so zu einem anderen Habitat zu gelangen. Zusätzlich würde die Repression der Gene, welche für Proteine der bakteriellen Chemotaxis und des Flagellenaufbaus kodieren, eine Energie- und Ressourcenersparnis für die Zelle bedeuten.

4.3.1.10 Gene der PHB-Synthese werden induziert

Die Expression von Genen, die für Proteine der Poly(β)hydroxybutyrat (PHB)-Synthese kodieren, wurde signifikant bis zu 2,9-fach induziert. Eine Vielzahl von Bakterien ist dazu befähigt, den Speicherstoff PHB als einen unlöslichen Einschluss im Cytoplasma zu synthetisieren. Dies geschieht, wenn in der Zelle ein hohes Angebot einer Kohlenstoffquelle vorliegt, das Wachstum jedoch einer anderen Limitierung (z.B. der Stickstoff- oder Phosphatquelle) unterliegt (Senior und Dawes, 1973). Hierbei werden zwei Moleküle Acetyl-CoA mit Hilfe des Enzyms Acetyl-CoA Acetyltransferase (*atoB*) zu Acetoacetyl-CoA umgesetzt. Dieses wird durch die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (*fabG*) zu R-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert, welches der PHB-Synthase (*phbC*) im Anschluss als Substrat dient. Die Expression dieser Gene war unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen um den Faktor 2,8 bis 2,9 erhöht. Desweiteren war die Genexpression von *phaP* um den Faktor 2,6 erhöht. Dieses Gen kodiert für das Protein Phasin, welches sich an der Oberfläche von PHB-Granulaten befindet. Dort dient es zur Stabilisierung des Granulates und verhindert zusätzliche ihre Koaleszenz (Neumann, 2008).

Die Bildung von PHB in *D. shibae* unter denitrifizierenden Bedingungen wurde mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt und ist in Abbildung 18 dargestellt. Unter diesen Wachstumsbedingungen steht den Bakterienzellen ausreichend Kohlenstoff zur Verfügung. Sie sind in ihrem Wachstum jedoch durch die geringere Energieausbeute mittels Denitrifikation limitiert.

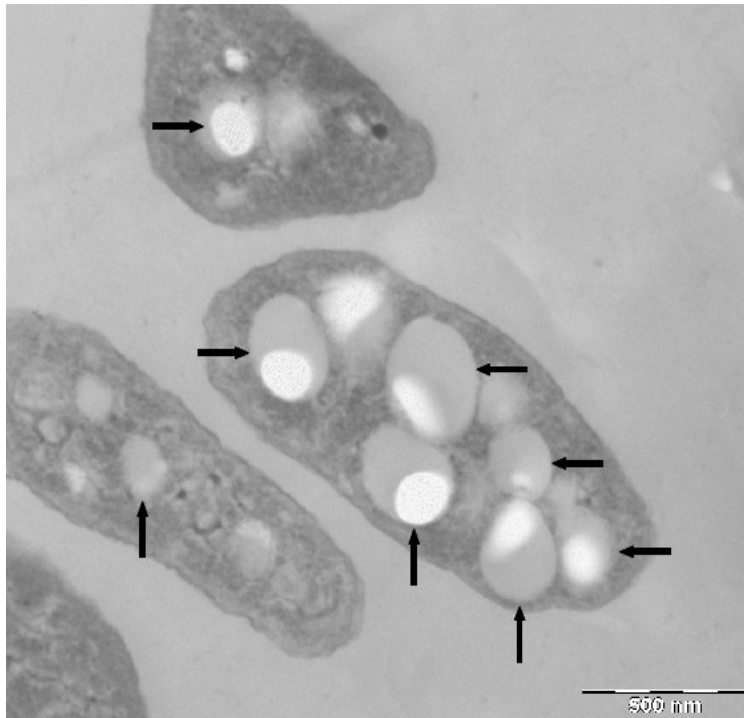


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *D. shibae*. Dargestellt ist ein Ausschnitt von *D. shibae* Zellen. Die Kultivierung erfolgte anaerob mit einem Zusatz von 25 mM Nitrat. Die Pfeile zeigen auf in der Zelle vorliegende Polyhydroxybutyrat (PHB)-Körnchen. (Aufnahme: Manfred Rohde, HZI).

4.3.1.11 Gene für Typ IV-Pilus/Sekretion werden reprimiert

Gene, welche für Proteine des Typ IV-Pilus/Sekretionssystems kodieren, waren in ihrer Expression durchschnittlich 4-fach reprimiert. Typ IV-Pili vermitteln u.a. die Bewegung eines Bakteriums über Oberflächen ohne Flagellenbewegung (Zucken bzw. Gleiten). Außerdem sind sie an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt (Bradley, 1980; Kohler *et al.*, 2000). Ähnlich wie bei der Repression flagellarer Gene könnte in diesem Falle auch eine mögliche Einsparung von Energie und Ressourcen eine mögliche Erklärung der Repression sein.

4.3.1.12 Gene der Translation werden reprimiert

Neunundzwanzig von 54 Genen, die anhand der Annotierung als ribosomale Gene eingeordnet wurden, wurden in den Transkriptomdaten als signifikant reprimiert dargestellt (durchschnittlich um den Faktor 3,6). Die Induktion der Expression eines Genes, welches für einen Regulator der TraR/DksA Familie kodiert, für welchen beschrieben ist, dass er die ribosomale RNA-Synthese abschwächt (siehe „regulatorische Proteine“), bestätigt

dieses Ergebnis. Zusätzlich wurden zwei Gene, die für Chaperonine kodieren (Dshi_2919 und Dshi_2920), sowie zwei für Elongationsfaktoren kodierende Gene (Dshi_0273 und Dshi_1549) als signifikant reprimiert vorgefunden (Faktor 3,3 bzw. Faktor 3,8). Ähnlich wie bei der Repression flagellarer Gene basiert die Repression von Genen, die für Translationsproteine kodieren, vermutlich auf der Einsparung von Energie und Ressourcen. Durch die Nutzung von Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor wird eine geringere Menge Energie generiert als unter aeroben Wachstumsbedingungen, wodurch sich Wachstum und Stoffwechsel der Zellen verlangsamen könnten. Nicht benötigte Funktionen, wie z.B. die Produktion von Flagellen, werden reprimiert, um Energie und Rohstoffe einzusparen.

4.3.1.13 Sonstige Gene

Eine Vielzahl weiterer Gene, welche sich nicht in die oben aufgeführten Gruppen einordnen ließen, war unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen reguliert. Zu erwähnen ist hier z.B. ein Gen (Dshi_353), welches für den zellulären Sauerstoffsensor PpaA kodiert. Dieses Gen ist in einer Vielzahl von anaerob (z.B. *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*) und aerob (z.B. *Roseobacter*, *Jannaschia*) anoxygenen photosynthetischen Proteobakterien in den für den Photosyntheseapparat kodierenden Genclustern lokalisiert (Moskvin *et al.*, 2010). Das Genprodukt PpaA aus *R. sphaeroides* (bzw. sein Homolog AerR aus *R. capsulatus* und *Rhodocystis centenum*) dient als Sauerstoff-abhängiger Regulator der Expression von Genen, deren Produkte in die Photosynthese involviert sind. Während das Protein in *R. sphaeroides* und *R. centenum* als aerober Aktivator der Genexpression beschrieben wurde, fungiert es in *R. capsulatus* als aerober Repressor. Die Sensitivität gegenüber Sauerstoff lässt sich hierbei durch eine Häm-enthaltende SCHIC (*sensor containing heme instead of cobalamin*)-Domäne erklären (Moskvin *et al.*, 2010). Unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat ist das Gen *ppaA* in *D. shibae* um den Faktor 2,7 reprimiert. In welcher Weise dessen Genprodukt die Expression der Gene in *D. shibae* reguliert, müsste in weiteren Versuchen untersucht werden.

Alle weiteren Gene dieser Gruppe, welche unter denitrifizierenden Bedingungen reguliert vorlagen, sind der Tab. A-1 im Anhang zu entnehmen.

4.3.1.14 Unbekannte Gene

Siebenunddreißig Genen, die unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen reguliert vorgefunden wurden, konnte keine Funktion ihres Genproduktes zugeordnet werden. Dazu gehörten z.B. solche, die im Genom in unmittelbarer Nähe des *arcDABC*-Clusters lagen (Dshi_0429, Dshi_0430 und Dshi_0438; von 3,0-fach bis 8,3-fache Induktion der Genexpression), sowie Gene, die nahe der Cluster der Denitrifikationsgene (Dshi_3152, Dshi_3156; 2,8-fache Induktion der Genexpression) lagen. Eine genauere Untersuchung der Funktion ihrer Genprodukte sowie deren Aufgabe unter denitrifizierenden Wachstumsbedingungen könnte mit Hilfe von Deletionsmutanten erfolgen.

4.3.2 Genexpression von *D. shibae* kultiviert unter anaerob denitrifizierenden Bedingungen mit Licht

Unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat mit einer definierten Menge Licht wurden 134 Gene signifikant stärker exprimiert als unter aeroben Bedingungen. Von diesen kodieren 46 Gene für hypothetische Proteine. Ebenso wurden unter diesen Bedingungen 118 Gene signifikant schwächer exprimiert als unter aeroben Bedingungen. Hiervon kodieren 15 Gene für hypothetische Proteine (Tab. A-2). Abzüglich dieser konnten den Genen der übrigen Transkripte verschiedene physiologische Funktionen wie Denitrifikation, Arginin-Fermentation, Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus, Transport, Stressantwort, Regulation, Polyhydroxybutyrat (PHB)-Synthese, Motilität und Chemotaxis, Translation, Elektronentransport sowie Typ IV-Pilus/Sekretion zugeordnet werden. Weitere Transkripte, deren Gene nicht den oben genannten physiologischen Funktionen zugeordnet werden konnten, wurden unter „Sonstige“ zusammengefasst (Tab. A-2). In den Diagrammen der Abbildung 19 ist dargestellt, welche Anzahl der signifikant stärker exprimierten Gene bzw. der signifikant schwächer exprimierten Gene der jeweiligen physiologischen Funktion zugeordnet wurde.

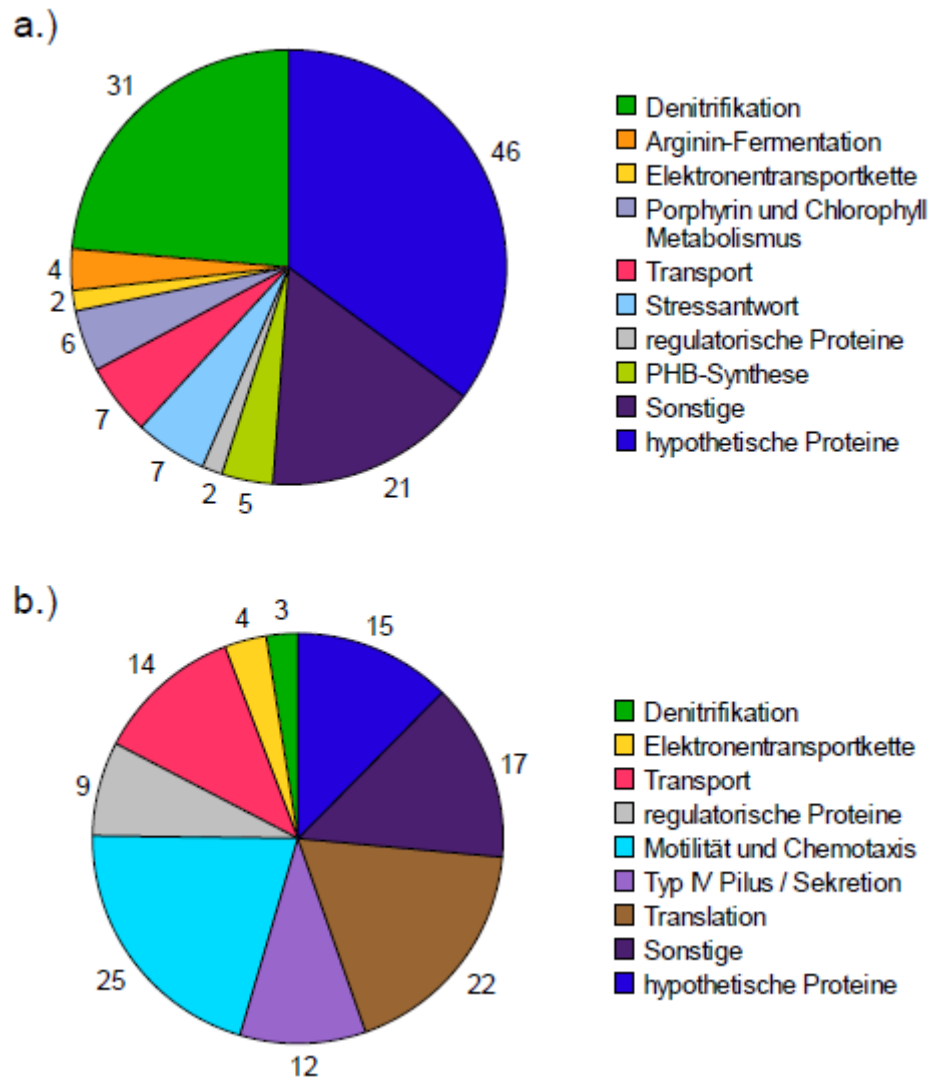


Abbildung 19: Physiologische Einteilung differentiell exprimierter Gene von *D. shibae* kultiviert mit 25 mM Nitrat und einer definierten Lichtmenge. Dargestellt ist die jeweilige physiologische Funktion der Produkte differentiell exprimierter Gene, sowie deren Anzahl. a.) signifikant induzierte Gene, b.) signifikant reprimierte Gene.

Unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat und einer definierten Menge Licht wurden annähernd doppelt so viele Gene in ihrer Expression signifikant induziert vorgefunden (134 induzierte Gene im Vergleich zu aeroben Bedingungen) wie unter denitrifizierenden Bedingungen und Lichtausschluss (76 induzierte Gene im Vergleich zu aeroben Bedingungen). Ein Großteil dieser zusätzlichen, in ihrer Expression induzierten Gene konnte allerdings auch in den Daten des Transkriptoms unter denitrifizierenden Bedingungen und Lichtausschluss induziert vorgefunden werden. Jedoch lag deren Induktionsfaktor dabei unter der Signifikanzgrenze einer 2,6-fachen Regulation. Die

Verteilung dieser im Transkriptom unter denitrifizierenden Bedingungen und einer definierten Menge Licht zusätzlichen, signifikant induzierten Gene erstreckte sich hierbei über alle zugeordneten Gruppen physiologischer Funktion. Es ließen sich lediglich sechs Gene identifizieren, welche ausschließlich unter denitrifizierenden Bedingungen und einer definierten Menge Licht signifikant induziert wurden. Dazu gehörten Gene, die für einen Zink ABC-Transporter, ein Außenmembranprotein der OmpA-Familie, ein Ferritin, sowie drei weitere hypothetische Proteine kodieren (Tab. A-2).

Die Anzahl in ihrer Expression reprimierten Gene war unter denitrifizierenden Bedingungen und einer definierten Lichtmenge (118 Gene im Vergleich zu aeroben Bedingungen) und unter denitrifizierenden Bedingungen und Lichtausschluss (126 Gene im Vergleich zu aeroben Bedingungen) fast identisch. Vier Gene, welche unter Lichtausschluss signifikant reguliert waren, konnten in dem Transkriptom mit einer definierten Menge Licht nicht identifiziert werden. Dazu gehörten Gene, die für ein universelles Stress-Protein, einen Regulator der XRE-Familie, den Sauerstoffsensor PpaA sowie ein hypothetisches Protein kodieren.

Die Art der Regulation entsprach für alle Gene unter denitrifizierenden Bedingungen und einer definierten Lichtmenge der gleichen wie unter Lichtausschluss. Auch die Faktoren, um welche die Genexpressionen jeweils reguliert waren, wiesen größtenteils keine nennenswerten Unterschiede auf. Insgesamt waren diese Faktoren im Transkriptom mit einer definierten Menge Licht in den meisten Fällen geringfügig höher. Im Folgenden wird lediglich auf die Gene eingegangen, deren Expression im Transkriptom mit einer definierten Lichtmenge auffällig stärker induziert bzw. reprimiert war als im Transkriptom unter Lichtausschluss. Dazu gehörten fast ausschließlich Gene, deren Produkte in die Denitrifikation involviert sind. Die Unterschiede in der Regulationsstärke dieser Gene in den Transkriptomen der beiden Bedingungen ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Vergleich der Transkriptomdaten von Genen, deren Produkte in die Denitrifikation involviert sind. Um einen möglichen Einfluss von Licht auf die Genexpression zu verdeutlichen, wurden die Faktoren, um welche die Genexpression in den miteinander verglichenen Transkriptomen verändert war, nebeneinander dargestellt. FC_{dunkel}: Änderung der Genexpression von *D. shibae* kultiviert unter denitrifizierenden Bedingungen und Lichtausschluss im Vergleich zu aeroben Bedingungen und Lichtausschluss. FC_{hell}: Änderung der Genexpression von *D. shibae* kultiviert unter denitrifizierenden Bedingungen und einer definierten Lichtmenge im Vergleich zu aeroben Bedingungen und einer definierten Lichtmenge. Die regulierten Gene sind jeweils mit ihrem Genlocus, ihrem Gennamen (sofern vergeben), sowie dem von ihnen kodierten Genprodukt aufgeführt.

Genlocus	Gennamen	Genprodukt	FC _{dunkel}	FC _{beleuchtet}
Dshi_2303		Protein der NnrS Familie	2,6	2,8
Dshi_2304		vermutlich NO-abhängiger Regulator DnrN oder NorA	4,2	5,7
Dshi_3165	<i>napA</i>	periplasmatische Nitratreduktase, katalytische Untereinheit	-2,9	-2,5
Dshi_3166	<i>napD</i>	periplasmatische Nitratreduktase	-3,2	-2,1
Dshi_3167	<i>napF</i>	periplasmatische Nitratreduktase, Ferredoxin-Typ Protein NapF	-3,6	-2,2
Dshi_3168	<i>nosX</i>	vermutlich NosX: Protein für die Reifung der N ₂ O-Reduktase	5,5	9,5
Dshi_3169	<i>cycA</i>	Cytochrom <i>c</i> , Klasse I	16,0	24,9
Dshi_3170	<i>nnrU</i>	hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit NnrU	3,2	3,3
Dshi_3171	<i>cbiX</i>	Cobalamin Biosynthese	4,2	6,8
Dshi_3172	<i>nirN</i>	Cytochrom <i>d₁</i> , besitzt Häm-Binde Region	4,8	10,2
Dshi_3173	<i>nirJ</i>	Radical SAM Domäne-tragendes Protein	4,6	10,3
Dshi_3174	<i>nirH</i>	transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,1	9,1
Dshi_3175	<i>nirG</i>	transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	5,1	8,1
Dshi_3176	<i>nirD</i>	transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,4	7,2
Dshi_3177	<i>nirF</i>	Cytochrom <i>d₁</i> Häm Region	6,5	13,2
Dshi_3178	<i>nirC</i>	hypothetisches Protein, putative Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase	6,5	8,7
Dshi_3179	<i>nirE</i>	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	7,5	16,6
Dshi_3180	<i>nirS</i>	Cytochrom <i>cd₁</i> Nitritreduktase	21,6	29,9
Dshi_3181	<i>nosR</i>	putativer transkriptioneller Regulator der N ₂ O-Reduktase	3,2	6,6
Dshi_3182	<i>nnrS</i>	hypothetisches Protein, vermutlich beteiligt an NO-Abbau, NnrS	3,7	9,3
Dshi_3183	<i>norC</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, kleine Untereinheit	14,1	31,1
Dshi_3184	<i>norB</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase	12,6	25,8
Dshi_3185	<i>norQ</i>	ATPase	10,0	15,8
Dshi_3186	<i>norD</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, Aktivierungsprotein	12,6	16,8
Dshi_3187	<i>norE</i>	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit III	2,9	3,8
Dshi_3188	<i>norF</i>	putatives NO-Reduktase Protein NorF	2,6	2,8
Dshi_3189	<i>dnrD</i>	transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	2,0	3,3
Dshi_3191	<i>dnr</i>	transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	4,3	6,0
Dshi_3192		hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>nos</i> -Cluster	5,2	10,9
Dshi_3193	<i>nosR</i>	putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	3,3	4,5
Dshi_3194	<i>nosZ</i>	Distickstoffmonoxid-Reduktase	9,1	14,9
Dshi_3195	<i>nosD</i>	NO-Reduktase Reifungsprotein NosD, periplasmatisches Cu-Bindeprotein	2,4	4,1
Dshi_3196	<i>nosF</i>	ABC-Transporter zugehörig	2,4	3,7
Dshi_3197	<i>nosY</i>	NO-Reduktase Protein NosY, ABC-Transporter zugehörig	2,5	2,7
Dshi_3198	<i>nosL</i>	Protein der NosL Familie	2,6	2,4
Dshi_3199	<i>nosX</i>	hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifung NosX	2,3	2,6

Einige Gene des für die Nitritreduktase kodierenden *nir*-Operons lagen im Transkriptom mit einer definierten Lichtmenge in ihrer Expression doppelt so stark induziert vor wie unter Lichtausschluss (Tab. 17). Ebenfalls deutlich stärker induziert waren die für die Stickstoffmonoxid-Reduktase kodierenden Gene *norB* und *norC* sowie andere Gene des

nor-Genclusters wie z.B. *nnrS* (Tab. 17). Aus welchem Grund fast ausschließlich Gene der Denitrifikation unter denitrifizierenden Bedingungen mit Licht deutlich stärker exprimiert wurden als unter denitrifizierenden Bedingungen ohne Licht ist nicht bekannt. Als AAnP betreibendes Bakterium sollte *D. shibae* unter anaeroben Bedingungen nicht in der Lage sein, Photosynthese zu betreiben. Demnach müsste ein Zugewinn von Energie durch Nutzung der Lichtenergie, der sich in einer stärkeren Expression der Gene der Denitrifikation niederschlägt, ausgeschlossen werden. Dennoch lässt sich ein direkter Einfluss von Licht auf die Genexpression vermuten. Einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum anhand der Wachstumsraten der beiden Kultivierungen ließ sich nicht feststellen. Diese betrug in beiden Fällen $0,05 \text{ h}^{-1}$.

Außer den für Proteine der Denitrifikation kodierenden Genen waren zwei weitere Gene in dem Transkriptom mit einer definierten Lichtmenge in ihrer Expression doppelt so stark induziert wie unter Lichtausschluss. Hierbei handelte es sich um die Gene mit den Loci Dshi_2796 (13,1-fach induzierte Genexpression) und Dshi_2892 (7,5-fache Genexpression), welche für Hitzeschockproteine Hsp20 kodieren. Beide Proteine wurden der physiologischen Gruppe der Stressantwort zugeordnet. Es ist denkbar, dass das zur Kultivierung der Zellen verwendete Licht unter anaeroben Bedingungen einen zusätzlichen Stressfaktor für *D. shibae* darstellt, welcher durch die vermehrte Produktion der Hsp20 Proteine kompensiert werden kann.

4.3.3 Genexpression von *D. shibae* kultiviert unter anaeroben fermentativen Wachstumsbedingungen mit 10 mM Arginin unter Lichtausschluss

4.3.3.1 Übersicht

Unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin unter Ausschluss von Licht wurden 71 Gene signifikant stärker exprimiert als unter aeroben Bedingungen unter Ausschluss von Licht. Von diesen kodieren 18 Gene für hypothetische Proteine. Ebenso wurden unter diesen Bedingungen 25 Gene signifikant schwächer exprimiert als unter aeroben Bedingungen. Hiervon kodieren sechs Gene für hypothetische Proteine (Tab. A-3). Abzüglich dieser konnte den Genprodukten der übrigen Transkripte verschiedene physiologische Funktionen wie Denitrifikation, Arginin-Fermentation, Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus, Transport, Stressantwort, Regulation, PHB-Synthese, Motilität und Chemotaxis,

Translation, Elektronentransport sowie Photosynthese zugeordnet werden. Weitere Transkripte, deren Genprodukte nicht den oben genannten physiologischen Funktionen zugeordnet werden konnten, wurden unter „Sonstige“ zusammengefasst (Tab. A-3). In den Diagrammen der Abbildung 20 ist dargestellt, welche Anzahl der signifikant stärker exprimierten Gene (a.) bzw. der signifikant schwächer exprimierten Gene (b.) der jeweiligen physiologischen Funktion zugeordnet wurde.

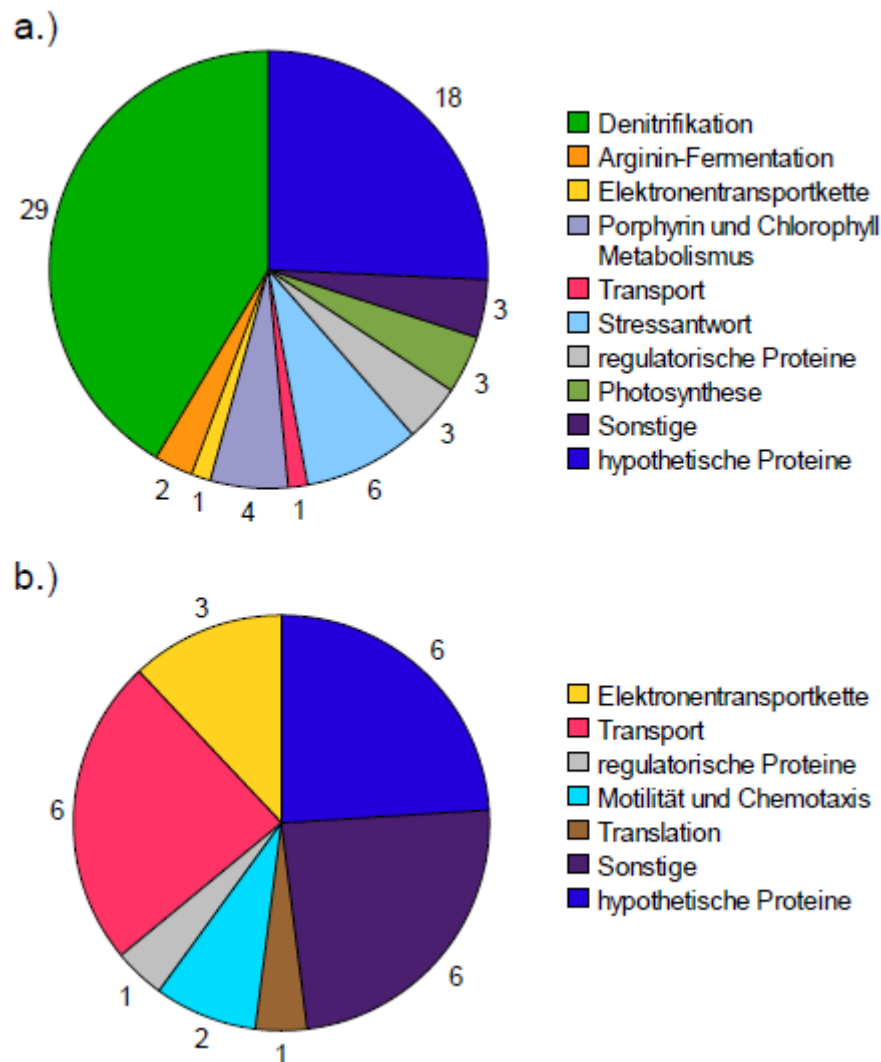


Abbildung 20: Physiologische Einteilung differentiell exprimierter Gene von *D. shibae* kultiviert mit 10 mM Arginin und Lichtausschluss. Dargestellt ist die jeweilige physiologische Funktion der Produkte differentiell exprimierter Gene, sowie deren Anzahl. a.) signifikant induzierte Gene, b.) signifikant reprimierte Gene.

Im Vergleich zu dem Transkriptom von *D. shibae* unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat und Lichtausschluss wurden unter fermentativen Bedingungen mit

10 mM Arginin deutlich weniger Gene signifikant stärker oder schwächer exprimiert. Die Gene, deren Expression signifikant induziert bzw. reprimiert war, wurden überwiegend auch im Transkriptom von *D. shibae* unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat in ihrer Expression signifikant induziert oder reprimiert vorgefunden (Tab. A-1 und A-3). Hierbei entsprach die Art der Regulation in allen Fällen jeweils der gleichen Tendenz. Neun signifikant regulierte Gene, welche unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat nicht im Transkriptom in Erscheinung traten, wurden identifiziert. Hierzu gehörten die zwei im Gencluster der Nitratreduktase lokalisierten Gene *Dshi_3160*, welches für ein hypothetisches Protein kodiert, sowie das für ein Cytochrom *c* kodierende Gen *napC*. Deren Genexpression lag im Transkriptom etwa dreifach induziert vor. Desweiteren zählten dazu Gene, die für einen Phosphat-Transporter, ein universelles Stress-Protein, ein Cytochrom, sowie vier verschiedene hypothetische Proteine kodieren. Eines der für ein hypothetisches Protein kodierenden Gene besitzt eine Fnr-Bindestelle im Promotorbereich (Tab. A-3).

Ansonsten ähnelte das Transkriptom unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin und Lichtausschluss dem unter denitrifizierenden Bedingungen und Lichtausschluss. So wurden alle Gene, deren Produkte in die Denitrifikation involviert sind, in ihrer Expression induziert gefunden. Dazu gehörten die Gene des *nirSECFDGHJN-cbiX-nnrU*-Clusters, des *norCBQDEF*-Clusters, des *nosRZDFYLX*-Clusters sowie für regulatorische Proteine kodierende Gene wie z.B. *dnr* und *nosX* (Tab. A-3). Der Faktor der Regulation war hierbei oftmals annähernd gleich. Lediglich der Faktor für die Genexpression von *norD*, der Stickstoffmonoxid-Reduktase, war unter denitrifizierenden Bedingungen und Lichtausschluss etwas höher (12,6-fache Regulation) als unter fermentativen Bedingungen mit Arginin und Lichtausschluss (7,2-fache Regulation). Diese Beobachtung könnte für eine Feinregulation des Genes durch bisher unbekannte Regulatoren, welche unter den spezifischen Bedingungen aktiv sind, sprechen. So wäre es möglich, dass die beiden Regulatoren DnrD und Dnr, deren Gene in unmittelbarer Nähe lokalisiert sind, einen feinregulatorischen Einfluss auf die Expression oben genannter Gene nehmen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Transkriptomen unter denitrifizierenden Bedingungen und fermentativen Bedingungen mit Arginin bestand in der Expression der für die periplasmatische Nitratreduktase kodierenden Gene. Während die Expression der

Gene *napFDA* unter denitrifizierenden Bedingungen reprimiert war, konnte eine Regulation derselbigen unter fermentativen Bedingungen mit Arginin nicht festgestellt werden (Tab. A-1 und A-3).

4.3.3.2 Gene der Denitrifikation werden induziert

Es wurde nicht erwartet, dass generell Gene der Denitrifikation unter fermentativen Bedingungen mit Arginin in dem vorgefundenen Maße reguliert waren. Zwar wird z.B. in *P. aeruginosa* sowohl die Expression der Gene der Denitrifikation als auch die der Arginin-Fermentation mittels des globalen Regulators Anr, ein Fnr-Homolog, reguliert, jedoch besitzt dieser Organismus eine Vielzahl weiterer untergeordneter regulatorischer Proteine, welche ebenfalls den anaeroben Metabolismus der Zellen kontrollieren. So aktiviert Anr in *P. aeruginosa* in Abwesenheit von Sauerstoff unter anderem die Transkription der für das Zwei-Komponentensystem NarX-NarL kodierenden Gene. NarX stellt eine Sensorkinase und NarL ihren korrespondierenden Antwortregulator dar. In Anwesenheit von Nitrat reprimiert aktives NarL die Transkription des *arcDABC*-Operons und aktiviert zusammen mit Anr die Transkription der für die Nitratreduktase und den Nitrat-Transporter NarK kodierenden Gene. Weiterhin aktivieren NarL und Anr unter anderem die Transkription des für den Regulator Dnr kodierenden Genes. Dnr detektiert Stickstoffmonoxid über ein gebundenes Häm und aktiviert daraufhin die Expression des *nir*-, *nor*- und *nos*-Operons. Ist kein Nitrat vorhanden, sind NarXL und Dnr nicht aktiviert. Folglich wird weder das *arcDABC*-Operon reprimiert, noch die Expression des *nir*-, *nor*- und *nos*-Operons aktiviert. Das *arcDABC*-Operon kann somit transkribiert werden. In Anwesenheit von Arginin wird dessen Transkription zusätzlich durch den Arginin-detektierenden Regulator ArgR verstärkt (Schobert und Tielen, 2010). In dem Genom von *D. shibae* wurden sechs Gene, welche für Regulatoren der Crp-Fnr-Familie kodieren, identifiziert. Eines dieser Proteine trägt die für die Bildung eines Sauerstoff-sensitiven $[4 \text{ Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters benötigten Cysteinreste und wurde als Fnr annotiert. Zwei weitere Proteine haben eine hohe Ähnlichkeit mit Dnr-Regulatoren (Wagner-Döbler *et al.*, 2010). Das als *fnr* annotierte Gen in *D. shibae* konnte unter fermentativen Bedingungen mit Arginin nicht reguliert vorgefunden werden. Die beiden als *dnr* bzw. *dnrD* annotierten Gene waren ähnlich stark reguliert wie unter denitrifizierenden Bedingungen (Tab. A-1 und A.3). Wie bereits schon in Kapitel 4.3.1.1 beschrieben kann es an einer möglichen konstitutiven Expression unter

aeroben wie anaeroben Bedingungen liegen, dass der Regulator Fnr in seiner Genexpression unter den hier untersuchten Bedingungen nicht reguliert vorlag. Lediglich die Funktionalität des Regulators wird, bedingt durch Konformationsänderungen, durch das Signal Sauerstoff reguliert.

Gene, die für ein Zwei-Komponentensystem wie NarXL oder einen Arginin-detektierenden Regulator ArgR kodieren, konnten nicht identifiziert werden. Die hier erhaltenen Daten der transkriptionellen Expression würden das Fehlen dieser Regulatoren bestätigen. Die Transkription der für die Nitratreduktase kodierenden Gene scheint jedoch durch das Signal Nitrat reguliert zu sein (Kapitel 4.3.1.1). Ob ein zusätzlicher Faktor in die Genexpression involviert ist, der z.B. die Expression von *napC* oder des Genlocus Dshi_3160 reguliert, ist hierbei nicht auszuschließen.

Sauerstoffmangel scheint für *D. shibae* als Hauptsignal zur Aktivierung der unterschiedlichen anaeroben Stoffwechselwege zu dienen. In einem komplexen Lebensraum wie dem Meer ist es unwahrscheinlich, dass z.B. strikt Nitrat-freie Bedingungen herrschen. *D. shibae* könnte vielmehr unterschiedliche Energiequellen zur gleichen Zeit nutzen und wäre so ideal an das jeweilig vorherrschende Nährstoffangebot angepasst. Dies wäre eine Erklärung für die auch bei Abwesenheit von Nitrat stark regulierten Gene der Denitrifikation.

4.3.3.3 Gene der Arginin-Fermentation werden induziert

Auch die für Proteine der Arginin-Fermentation kodierenden Gene waren unter fermentativen Bedingungen in gleicher Weise reguliert wie unter denitrifizierenden Bedingungen. Hierbei war der Faktor der induzierten Genexpression unter denitrifizierenden Bedingungen (3,0 bis 5,9-fach) jeweils höher als unter fermentativen Bedingungen mit Arginin (2,0 bis 3,6-fach) (Tab. A-1 und A-3).

4.3.3.4 Differentielle Expression von Genen anderer Elektronentransportketten-Enzyme

Die signifikant regulierten Gene, die für Komponenten der Elektronentransportkette kodieren, unterschieden sich in dem Transkriptom der unter fermentativen Bedingungen mit Arginin kultivierten Zellen von *D. shibae* kaum von denen unter denitrifizierenden Bedingungen. Es wurde ein zusätzliches Gen, welches für ein Cytochrom *c* kodiert, induziert vorgefunden. Zwei weitere Gene, welche für ein Cytochrom *c* bzw. ein Cytochrom *bd* kodieren, konnten im Gegensatz zu dem Transkriptom unter

denitrifizierenden Bedingungen hier jedoch nicht identifiziert werden. Diese Beobachtung weist auf eine unterschiedliche Zugehörigkeit der Cytochrome zu verschiedenen Elektronentransportketten hin. Je nach vorherrschender Bedingung werden verschiedene Wege des Energietransfers genutzt, an denen unterschiedliche Cytochrome beteiligt sind. Die unter beiden Bedingungen regulierten Gene zeigten in ihrer Regulation jeweils den gleichen Trend. Hierbei waren einige Gene unter denitrifizierenden Bedingungen jedoch deutlich stärker reguliert (Tab. A-1 und A-3).

4.3.3.5 Gene des Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus

Ebenfalls ähnlich wie unter denitrifizierenden Bedingungen reguliert waren die Gene des Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus. Während die für den Cobalt-Transporter kodierende Gene *cbtA* und *cbtB* in ihrer Expression unter dem Signifikanzwert einer 2,6-fachen Regulation lagen, waren die für Enzyme der Häm-Biosynthese kodierenden Gene *hemN1*, *hemN2* und *hemA* in ihrer Expression ähnlich stark induziert wie unter denitrifizierenden Bedingungen. Ein Gen (*Dshi_2637*), welches für eine Cyclase für die anaerobe Umsetzung von Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylester zu Divinylprotochlorophyllid kodiert, war unter fermentativen Bedingungen 4,2-fach in seiner Expression induziert, während es mit einer 2,4-fachen Induktion unter denitrifizierenden Bedingungen unter der definierten Signifikanzgrenze lag. Diese Cyclase wird für den anaeroben Stoffwechselweg der Chlorophyll-Biosynthese benötigt, deren Endprodukt unter anderem Bakteriochlorophyll *a* bildet. Unter fermentativen Bedingungen mit Arginin wurden außerdem Gene, die für die α/β -Untereinheit von Antennenkomplexen kodieren, um Faktoren von 2,7 bis 3,8 in ihrer Expression induziert vorgefunden (*Dshi_2900*, *Dshi_3521* und *Dshi_3522*), sowie weitere Gene des Photosyntheseapparates, die in ihrer Expression etwa zweifach reguliert waren (Tab. A-3). Unter denitrifizierenden Bedingungen lag die Expression von Genen des Photosyntheseapparates mit einer 2- bis 2,5-fachen Induktion unter der Signifikanzgrenze (Tab. A-3, „Photosynthese“). Da unter fermentativen Bedingungen mit Arginin deutlich weniger Energie generiert wird als unter denitrifizierenden Bedingungen wäre es denkbar, dass *D. shibae* zusätzlich verstärkt Bakteriochlorophyll *a* bildet, um den Energiemangel durch Photosynthese zu kompensieren. Auf den Aspekt der Photosynthese wird in Kapitel 4.3.5 ausführlicher eingegangen.

4.3.3.6 Gene für Transportproteine

Größere Unterschiede in der Regulation der Genexpression zwischen denitrifizierenden und fermentativen Bedingungen ließen sich bei Genen finden, welche für Transportproteine kodieren. Einige unter denitrifizierenden Bedingungen regulierte, für Transporter kodierende Gene konnten in dem Transkriptom der unter fermentativen Bedingungen mit Arginin gewachsenen Zellen nicht reguliert vorgefunden werden oder ihre Expression lag deutlich unter der Signifikanzgrenze. Besonders hervorzuheben ist hierbei ein Gen (Dshi_1663), welches für einen Nitrat ABC-Transporter kodiert und in dem Transkriptom der unter fermentativen Bedingungen mit Arginin gewachsenen Zellen nicht verändert exprimiert war. In *P. aeruginosa* wird die Expression der Gene des Nitrattransporters NarK über das bereits erwähnte Zwei-Komponentensystem NarXL reguliert, dessen Aktivität von dem Signal Nitrat abhängig ist (Schobert und Tielen, 2010). Für *narX* und *narL* kodierende Gene konnten in der Annotation von *D. shibae* nicht identifiziert werden. Jedoch ist die induzierte Genexpression eines Nitrattransporters unter denitrifizierenden Bedingungen ein Hinweis darauf, dass ein bisher unbekannter Regulator die Expression der Gene in Abhängigkeit von dem Signal Nitrat reguliert (Kap. 4.3.1.1).

4.3.3.7 Gene der allgemeinen Stressantwort werden induziert

Ebenfalls einige Unterschiede ließen sich bei der Expression von Genen, die für Proteine der Stressantwort in *D. shibae* kodieren, feststellen. Ein unter denitrifizierenden Bedingungen induziertes Gen, welches für ein Kälteschockprotein kodiert (Dshi_0769), sowie ein induziertes Gen, welches für ein UspA Protein kodiert (Dshi_1807), konnten unter fermentativen Bedingungen mit Arginin in ihrer Expression nicht als reguliert identifiziert werden. Dafür wurde unter fermentativen Bedingungen mit Arginin ein anderes, bereits erwähntes Gen induziert vorgefunden, das für das UspA Protein kodiert (Dshi_2686). Dieses erschien unter denitrifizierenden Bedingungen nicht im Transkriptom. Unter gegebenen Kultivierungsbedingungen scheinen demnach zum Schutz der Zelle andere Stressproteine benötigt zu werden. Die physiologische Funktion von UspA Proteinen ist noch nicht bekannt. Für *P. aeruginosa* ist allerdings bekannt, dass universelle Stress-Proteine unter spezifischen Bedingungen aktiv sind. So wird z.B. das der UspA-Familie zugehörige UspN in der Stationärphase unter anaeroben Bedingungen produziert, während UspK unter fermentativen Bedingungen mit Pyruvat während des Langzeitüberlebens

produziert wird (Boes *et al.*, 2006; Schreiber *et al.*, 2006). Es ist also durchaus denkbar, dass Dshi_2686 für ein spezifisches Protein kodiert, welches zum Schutz vor Stress, hervorgerufen durch die fermentativen Kultivierungsbedingungen mit Arginin, benötigt wird.

4.3.3.8 Gene für regulatorische Proteine

Von zwölf unter denitrifizierenden Bedingungen regulierten Genen, welche für regulatorische Proteine kodieren, konnten sechs in ihrer Expression unter fermentativen Bedingungen mit Arginin nicht reguliert vorgefunden werden. Dazu gehörten der für den putativen Anti-Sigma Regulationsfaktor kodierende Genlocus Dshi_0072, die für transkriptionelle Regulatoren kodierenden Genloci Dshi_0212, Dshi_1508, Dshi_2775 und Dshi_4067, sowie die für Antwortregulatoren kodierenden Genloci Dshi_2631 und Dshi_2820. Die Expression eines weiteren, für einen transkriptionellen Regulator kodierenden Genes war deutlich schwächer reguliert (Dshi_0765) und lag unter der definierten Signifikanzgrenze. Für alle anderen unter beiden Bedingungen reguliert vorgefundenen Gene, die für regulatorische Proteine kodieren, lässt sich eine mögliche gemeinsame Antwort auf das Signal Sauerstoff postulieren. Welche spezifische Regulation innerhalb der verschiedenen Bedingungen diesen Regulatoren unterliegt könnte z.B. mit Hilfe von Transposonmutanten weiterhin untersucht werden.

4.3.3.9 Gene für Motilität und Chemotaxis werden reprimiert

Im Vergleich zu denitrifizierenden Bedingungen war eine deutlich geringere Anzahl von Genen, welche für Proteine der Motilität und Chemotaxis sowie der Translation kodieren, unter fermentativen Bedingungen mit Arginin in ihrer Expression reguliert. Auch war ihre Repression wesentlich geringer als unter denitrifizierenden Bedingungen. Ebenso wie unter denitrifizierenden Bedingungen kann in diesem Fall auch eine mögliche Einsparung von Energie und Ressourcen eine Erklärung der Repression sein.

4.3.3.10 Sonstige Gene

Auch die Regulation der Expression der zur Gruppe „Sonstige“ zusammengefassten Gene unterschied sich nur geringfügig von der Regulation unter denitrifizierenden Bedingungen. Ein deutlicher Unterschied ließ sich vor allem bei den für die Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase kodierenden Genen feststellen (Dshi_2659 und Dshi_2660). Diese waren unter denitrifizierenden Bedingungen mindestens zweimal stärker reprimiert als unter fer-

mentativen Bedingungen mit Arginin (durchschnittlich 8-fach unter denitrifizierenden Bedingungen und durchschnittlich 4-fach unter fermentativen Bedingungen mit Arginin). Fünf weitere, unter denitrifizierenden Bedingungen in ihrer Expression regulierte Gene lagen unter fermentativen Bedingungen mit Arginin weit unter der Signifikanzgrenze oder fehlten gänzlich. Ein unter denitrifizierenden Bedingungen unter Lichtausschluss in seiner Genexpression induzierter Sauerstoffsensor PpaA (Dshi_3532) lag unter fermentativen Bedingungen mit Arginin und Lichtausschluss ebenfalls reprimiert vor. Jedoch lag der Faktor der Induktion seiner Genexpression unter der definierten Signifikanzgrenze (1,8-fach reguliert).

4.3.3.11 Unbekannte Gene

Eine Vielzahl der unter denitrifizierenden Bedingungen signifikant regulierten Gene, welche für hypothetische Proteine kodieren, wurde ebenfalls im Transkriptom der unter fermentativen Bedingungen mit Arginin kultivierten Zellen reguliert vorgefunden. Sechs unter denitrifizierenden Bedingungen regulierte Gene konnten unter fermentativen Bedingungen mit Arginin nicht reguliert vorgefunden werden. Ebenso wurden, wie bereits erwähnt, vier Gene unter fermentativen Bedingungen mit Arginin als reguliert identifiziert, welche in dem Transkriptom unter denitrifizierenden Bedingungen nicht reguliert vorlagen. Eines dieser Gene (Dshi_1454) besitzt eine Fnr-Bindestelle im Promotorbereich (Tab. A-1 und A-3).

4.3.4 Genexpression von *D. shibae* kultiviert unter anaeroben fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin und Licht

Unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin und einer definierten Menge Licht wurden 87 Gene signifikant stärker exprimiert als unter aeroben Bedingungen. Von diesen kodieren 18 Gene für hypothetische Proteine. Ebenso wurden unter diesen Bedingungen 80 Gene signifikant schwächer exprimiert als unter aeroben Bedingungen. Hiervon kodieren 17 Gene für hypothetische Proteine (Tab. A-2). Abzüglich dieser konnten den Genprodukten der übrigen Transkripte verschiedene physiologische Funktionen wie Denitrifikation, Arginin-Fermentation, Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus, Transport, Stressantwort, Regulation, Motilität und Chemotaxis, Translation, Elektronentransport sowie Typ IV-Pilus/Sekretion zugeordnet werden. Weitere Transkripte, deren Gene nicht den oben genannten physiologischen Funktionen zugeordnet werden konnten, wurden

unter „Sonstige“ zusammengefasst (Tab. A-2). In den Diagrammen der Abbildung 21 ist dargestellt, welche Anzahl der signifikant stärker exprimierten Gene bzw. der signifikant schwächer exprimierten Gene der jeweiligen physiologischen Funktion zugeordnet wurde.

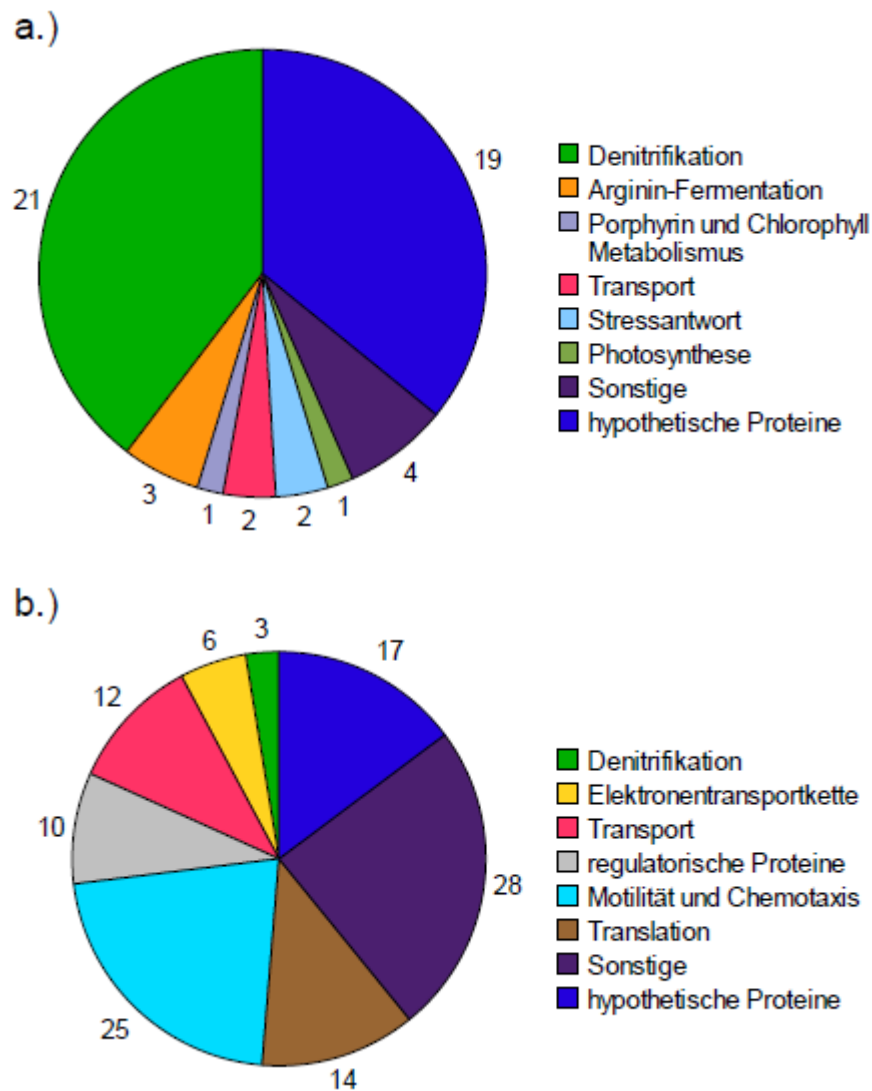


Abbildung 21: Physiologische Einteilung differenziell exprimierter Gene von *D. shibae* kultiviert mit 10 mM Arginin mit einer definierten Lichtmenge. Dargestellt ist die jeweilige physiologische Funktion der Produkte differenziell exprimierter Gene sowie deren Anzahl. a.) signifikant induzierte Gene, b.) signifikant reprimierte Gene.

Das Transkriptom von *D. shibae* unter fermentativen Bedingungen mit Arginin und Licht wies keine bedeutenden Unterschiede zu dem Transkriptom unter fermentativen Bedingungen mit Arginin unter Lichtausschluss auf. Gene, die in ihrer Expression unter beiden Bedingungen im Vergleich zu aeroben Wachstum reguliert waren, zeigten in der Art

ihrer Regulation stets die gleiche Tendenz. Auch der Faktor der Regulation war in allen diesen Fällen sehr ähnlich. Der einzige nennenswerte Unterschied in der Genexpression bei dem Vergleich beider Bedingungen ist die Expression von *napA* und *napF* sowie ferner des Genlocus Dshi_0686, welcher neben zwei weiteren Genloci als putativer Regulator der Stickstoffmonoxid-Reduktase annotiert wurde. Diese Gene wurden im Transkriptom unter fermentativen Bedingungen mit Arginin unter Lichtausschluss nicht in ihrer Expression reguliert vorgefunden. In dem Transkriptom der mit Licht inkubierten Zellen lagen sie (ebenso wie in den Transkriptomen der unter denitrifizierenden Bedingungen gewachsenen Zellen) reprimiert vor.

Bei dem Vergleich der denitrifizierenden Bedingungen mit und ohne Licht zueinander konnten Gene des *nir*- und *nor*-Operons in dem Transkriptom der mit Licht inkubierten Zellen deutlich stärker exprimiert vorgefunden werden (Kap. 4.3.2). Solch eine spezifische Verstärkung der Genexpression einzelner Gene konnte im Transkriptom unter fermentativen Bedingungen mit Arginin unter Lichtausschluss nicht festgestellt werden.

4.3.5 Differentiell exprimierte Gene unter fermentativen Wachstumsbedingungen mit 10 mM Arginin und Lichtausschluss verglichen mit dem Wachstum mit einer definierten Menge Licht

Unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin unter Ausschluss von Licht wurden 39 Gene signifikant stärker exprimiert als unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin mit einer definierten Menge Licht. Von diesen kodieren drei Gene für hypothetische Proteine. Ebenso wurde unter Lichtausschluss ein Gen signifikant schwächer exprimiert als mit Licht (Tab. A-5). Den Genprodukten der Transkripte wurden ihre physiologischen Funktionen wie Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus, Carotinoid-Biosynthese, Photosynthese und Stressantwort zugeordnet. Transkripte, deren Genprodukte nicht einer physiologischen Funktion zugeordnet werden konnten, wurden unter „Sonstige“ zusammengefasst (Tab. A-5).

Fast alle Genprodukte der im Transkriptom differentiell exprimierten Gene konnten der physiologischen Funktion Porphyrin- und Chlorophyll-Biosynthese, Carotinoid-Biosynthese sowie Photosynthese zugeordnet werden. Dreiunddreißig diesen Gruppen zugehörige Gene wurden in ihrer Expression signifikant induziert (bis zu 11,7-fach). All

diese induzierten Gene kodieren für Proteine, welche für die Generierung des Photosyntheseapparates in *D. shibae* benötigt werden, wie Bacteriochlorophyll *a*, das Carotinoid Spheroidenon, Lichtsammelkomplexe und das Photosynthese-Reaktionszentrum (Tab. A-5).

Für aerob anoxygene photosynthetische (AAnP) Bakterien, zu denen auch *D. shibae* gehört, wurde beschrieben, dass die Expression der für den Photosyntheseapparat kodierenden Gene unter Lichtausschluss erfolgt. Dabei kann die Expression schon durch geringste Lichtmengen stark reprimiert werden (Yurkov und Beatty, 1998). Weiterhin erfolgt die Biosynthese des Photosystems in AAnP Bakterien nur unter aeroben Bedingungen (Yurkov und Beatty, 1998; Wesley *et al.*, 2007). Folglich wurde unter den hier untersuchten Bedingungen keine Expression von Photosynthese-Genen erwartet. Zwar müsste der Lichtausschluss induzierend auf die Expression wirken, jedoch würde das anaerobe Milieu diese reprimieren. Tatsächlich wurden in dem hier analysierten Transkriptom Gene des Photosyntheseapparates reguliert vorgefunden. Dies bedeutet, dass *D. shibae* scheinbar in der Lage ist, auch unter anaeroben Bedingungen unter Lichtausschluss seinen Photosyntheseapparat zu synthetisieren. Ein optischer Vergleich anaerob und aerob unter Lichtausschluss kultivierter *D. shibae* Kulturen zeigte aber, dass die Produktion des Photosyntheseapparates unter anaeroben Bedingungen lediglich in sehr geringen Maßen stattfinden kann. Während die aerobe Kultur eine durch das Spheroidenon hervorgerufene dunkelrosa Färbung zeigte, erschien die anaerobe Kultur eher beige. Abbildung 22 zeigt die Färbung der Zellen im Vergleich zueinander.

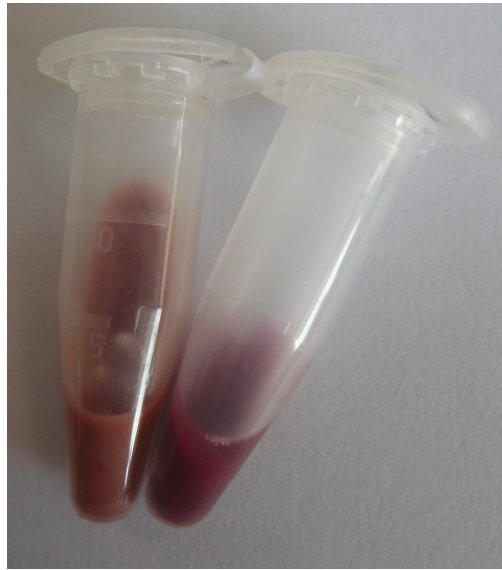


Abbildung 22: Vergleich der Pigmentierung anaerob und aerob kultivierter Zellen von *D. shibae*. Links im Bild dargestellt sind *D. shibae* Zellen aus der anaeroben Kultivierung mit 25 mM Nitrat. Rechts im Bild *D. shibae* Zellen aus einer aeroben Kultivierung. Beide Kultivierungen erfolgten unter Lichtausschluss.

Ob und in welchem Maße *D. shibae* befähigt ist, unter anaeroben Bedingungen den Photosyntheseapparat zu bilden und Photosynthese durchzuführen, müsste in weiteren Versuchen detaillierter analysiert werden. Dazu wären z.B. geänderte Kultivierungsbedingungen (definierte Hell-Dunkel-Rhythmen) sowie quantitative Bacteriochlorophyll *a* Bestimmungen notwendig.

5 Zusammenfassung

Die *Roseobacter*-Gruppe gehört zu den dominanten Bakteriengruppen mariner Habitate. Über ihre Physiologie und zugehörige Genetik ist wenig bekannt.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die methodischen Grundlagen für eine genetische Analyse von Mitgliedern der *Roseobacter*-Gruppe gelegt. Es wurden Transformationsprotokolle mittels Elektroporation und Transduktion etabliert. Stabil replizierbare Plasmide wurden identifiziert und ein Sauerstoff-unabhängiges Reportergensystem erfolgreich getestet.

Im zweiten Teil wurde das Sekretom verschiedener Stämme der *Roseobacter*-Gruppe funktionell mittels Enzymnachweisverfahren und strukturell mittels 2D-Gelelektrophorese basierten *Proteomics* bestimmt. Eine Adaption des Sekretomes an sich ändernde Nährstoffbedingungen wurde beobachtet.

Schließlich wurde die anaerobe Genexpression von *Dinoroseobacter shibae* umfassend für denitrifizierende und Arginin-fermentierende Bedingungen in Abhängigkeit von Licht mittels DNA-Array Analysen erfasst. Eine generelle anaerobe Induktion von über siebzig Genen ohne großen Einfluss von Nitrat, Arginin oder Licht wurde beobachtet.

Zusammengefasst wurden im Rahmen dieser Arbeit wesentliche methodische und intellektuelle Grundlagen für eine zukünftige systembiologische Charakterisierung der *Roseobacter*-Gruppe gelegt.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit geschaffenen Grundlagen bieten eine Vielzahl von Möglichkeiten für weiterführende Arbeiten zur physiologischen Charakterisierung von *D. shibae* DFL12^T.

Im Rahmen der Sekretomanalysen von *D. shibae* DFL12^T wären folgende Untersuchungen interessant:

1. Etablierung eines Modells zur Kultivierung von *D. shibae* in Biofilmen und Sekretomanalysen dieser Kultivierungen.
2. Sekretomanalysen der Kokultivierungen von *D. shibae* mit *I. galbana* in größeren Maßstäben mit höheren optischen Dichten.
3. Kultivierung von *D. shibae* in Biofilmen innerhalb einer mikrobiellen Gemeinschaft verschiedener mariner Bakterien.

Zur weiteren Untersuchung des anaeroben Regulons von *D. shibae* DFL12^T wären folgende Arbeiten denkbar:

1. Konstruktion von Transposonmutanten zur Identifizierung putativer Regulatoren.
2. Transkriptomanalysen von *D. shibae* aus chemostatischen Kultivierungen, um mögliche Wachstumslimitierungen auszuschließen.
3. Transkriptomanalyse einer bereits konstruierten *dnr*-Knock-out Mutante zur Bestimmung der Bedeutung von Dnr für den anaeroben Stoffwechsel.

7 Literaturverzeichnis

Albertson NH; Nystrom T; Kjelleberg S (1990). Starvation-induced modulations in binding protein-dependent glucose transport by the marine *Vibrio* sp. S14. *FEMS Microbiol Lett* **58** (2), S. 205–209.

Allgaier M; Uphoff H; Felske A; Wagner-Döbler I (2003). Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. *Appl Environ Microbiol* **69** (9), S. 5051–5059.

Allwood MC; Brown PW (1993). Stability of ampicillin infusions in unbuffered and buffered saline. *International Journal of Pharmaceutics* **97** (1-3), S. 219–222.

Ammerman JW; Azam F (1985). Bacterial 5-nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science* **227** (4692), S. 1338–1340.

Ansede JH; Friedman R; Yoch DC (2001). Phylogenetic analysis of culturable dimethyl sulfide-producing bacteria from a spartina-dominated salt marsh and estuarine water. *Appl Environ Microbiol* **67** (3), S. 1210–1217.

Antelmann H; Tjalsma H; Voigt B; Ohlmeier S; Bron S; van Dijk JM; Hecker M (2001). A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res* **11** (9), S. 1484–1502

Antonioli P; Bachi A; Fasoli E; Righetti PG (2009). Efficient removal of DNA from proteomic samples prior to two-dimensional map analysis. *J Chromatogr A* **1216** (17), S. 3606–3612.

Antranikian G (1992). Microbial Degradation of Natural Products. Winkelmann G (ed) Weinheim:VCH-Verlagsgesellschaft, S. 27–56.

Arai H; Kodama T; Igarashi Y (1997). Cascade regulation of the two CRP/FNR-related transcriptional regulators (ANR and DNR) and the denitrification enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **25** (6), S. 1141–1148.

Arata H; Shimizu M; Takamiya K (1992). Purification and properties of trimethylamine N-oxide reductase from aerobic photosynthetic bacterium *Roseobacter denitrificans*. *J Biochem* **112** (4), S. 470–475.

Arnosti C (2003). Fluorescent derivatization of polysaccharides and carbohydrate-containing biopolymers for measurement of enzyme activities in complex media. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **793** (1), S. 181–191.

Askonas BA (1951). The use of organic solvents at low temperature for the separation of enzymes; application to aqueous rabbit muscle extract. In: *Biochem J* **48** (1), S. 42–48.

Bartnikas TB; Wang Y; Bobo T; Veselov A; Scholes CP; Shapleigh JP (2002). Characterization of a member of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 encoding a haem-copper protein. *Microbiology* **148** (Pt 3), S. 825–833.

Bartnikas TB; Tosques IE; Laratta WP; Shi J; Shapleigh JP (1997). Characterization of the nitric oxide reductase-encoding region in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *J Bacteriol* **179** (11), S. 3534–3540.

- Bassler BL (1999).** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2** (6), S. 582–587.
- Bedzyk L; Wang T; Ye RW (1999).** The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification. *J Bacteriol* **181** (9), S. 2802–2806.
- Beja O; Suzuki MT; Heidelberg JF; Nelson WC; Preston CM; Hamada T et al. (2002).** Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature* **415** (6872), S. 630–633.
- Bell LC; Richardson DJ; Ferguson SJ (1990).** Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*. The periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. *FEBS Lett* **265** (1-2), S. 85–87.
- Biebl H; Allgaier M; Tindall BJ; Koblizek M; Lunsdorf H; Pukall R; Wagner-Döbler I (2005):** *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *Int J Syst Evol Microbiol* **55** (Pt 3), S. 1089–1096.
- Blankschien MD; Potrykus K; Grace E; Choudhary A; Vinella D; Cashel M; Herman C (2009).** TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS Genet* **5** (1), S. e1000345.
- Boes N; Schreiber K; Schobert M (2008).** SpoT-triggered stringent response controls usp gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190** (21), S. 7189–7199.
- Boes N; Schreiber K; Hartig E; Jaensch L; Schobert M (2006).** The *Pseudomonas aeruginosa* universal stress protein PA4352 is essential for surviving anaerobic energy stress. *J Bacteriol* **188** (18), S. 6529–6538.
- Boettcher KJ; Barber BJ; Singer JT (2000).** Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the *Roseobacter* group and colonization of nonaffected animals by *Stappia stellulata*-like strains. *Appl Environ Microbiol* **66** (9), S. 3924–3930.
- Bradley DE (1980).** A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26** (2), S. 146–154.
- Brinkhoff T; Bach G; Heidorn T; Liang L; Schlingloff A; Simon M (2004).** Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl Environ Microbiol* **70** (4), S. 2560–2565.
- Brinkhoff T; Giebel HA; Simon M (2008).** Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Arch Microbiol* **189** (6), S. 531–539.
- Bruhn JB; Gram L; Belas R (2007).** Production of antibacterial compounds and biofilm formation by *Roseobacter* species are influenced by culture conditions. *Appl Environ Microbiol* **73** (2), S. 442–450.
- Buchan A; Gonzalez JM; Moran MA (2005).** Overview of the marine *Roseobacter* lineage. *Appl Environ Microbiol* **71** (10), S. 5665–5677.
- Calcott PH; MacLeod RA (1975).** The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: the relative importance of wall and membrane damage. *Can J Microbiol* **21** (12), S. 1960–1968.

- Casadaban MJ; Cohen SN (1980).** Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138** (2), S. 179–207.
- Chen H; Yang B; Chen X (2009).** Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China. *Microbiol Res* **164** (6), S. 613–623.
- Christie-Oleza JA; Armengaud J (2010).** In-depth analysis of exoproteomes from marine bacteria by shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 case-study. *Mar Drugs* **8** (8), S. 2223–2239.
- Chróst R J; Münster U; Rai H; Albrecht D; Wetzel K P; Overbeck J (1989).** Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of eutrophic lake. *J Plankton Res* **11**, S. 223–242.
- Chróst RJ (1991).** Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. S.29-59. RJ Chróst (ed.), *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer Verlag, New York.
- Cianciotto NP (2005).** Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13** (12), S. 581–588.
- Cotta MA (1992).** Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Appl Environ Microbiol* **58** (1), S. 48–54.
- Couturier M; Bex F; Bergquist PL; Maas WK (1988).** Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* **52** (3), S. 375–395.
- Curson AR; Rogers R; Todd JD; Brearley CA; Johnston AW (2008).** Molecular genetic analysis of a dimethylsulfoniopropionate lyase that liberates the climate-changing gas dimethylsulfide in several marine *alpha*-proteobacteria and *Rhodobacter sphaeroides*. *Environ Microbiol* **10** (3), S. 757–767.
- Cuypers H; Viebrock-Sambale A; Zumft WG (1992).** NosR, a membrane-bound regulatory component necessary for expression of nitrous oxide reductase in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* **174** (16), S. 5332–5339.
- D'amato RF; Thornsberry C; Baker CN; Kirven LA (1975).** Effect of calcium and magnesium ions on the susceptibility of *Pseudomonas* species to tetracycline, gentamicin polymyxin B, and carbenicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **7** (5), S. 596–600.
- Davies SJ; Golby P; Omrani D; Broad SA; Harrington VL; Guest JR *et al.* (1999).** Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181** (18), S. 5624–5635.
- de Beer D; Stoodley P; Roe F; Lewandowski Z (1994).** Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering* **43** (11), S. 1131–1138.
- de Boer AP; van der Oost J; Reijnders WN; Westerhoff HV; Stouthamer AH; van Spanning RJ (1996).** Mutational analysis of the *nor* gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* **242** (3), S. 592–600.
- de la Cruz F; Davies J (2000).** Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* **8** (3), S. 128–133.

Delepelaire P (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694** (1-3), S. 149–161.

DiSpirito AA; Lipscomb JD; Lidstrom ME (1990). Soluble cytochromes from the marine methanotroph *Methylomonas* sp. strain A4. *J Bacteriol* **172** (9), S. 5360–5367.

Dower WJ; Miller JF; Ragsdale CW (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16** (13), S. 6127–6145.

Drapeau GR; MacLeod RA (1963). Nutrition and Metabolism of Marine Bacteria. XII. Ion Activation of Adenosine Triphosphatase in Membranes of Marine Bacterial Cells. *J Bacteriol* **85**, S. 1413–1419.

Drapeau GR; Matula TI; MacLeod RA (1966). Nutrition and metabolism of marine bacteria. XV. Relation of Na⁺-activated transport to the Na⁺ requirement of a marine *pseudomonad* for growth. *J Bacteriol* **92** (1), S. 63–71.

Drepper T; Eggert T; Circolone F; Heck A; Krauss U; Guterl JK et al. (2007). Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25** (4), S. 443–445.

Evans FF; Raftery MJ; Egan S; Kjelleberg S (2007). Profiling the secretome of the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* using amine-specific isobaric tagging (iTRAQ). *J Proteome Res* **6** (3), S. 967–975.

Fiedler S; Wirth R (1988). Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem* **170** (1), S. 38–44.

Filloux A (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694** (1-3), S. 163–179.

Fornari CS; Kaplan S (1982). Genetic transformation of *Rhodopseudomonas sphaeroides* by plasmid DNA. *J Bacteriol* **152** (1), S. 89–97.

Furste JP; Pansegrau W; Frank R; Blocker H; Scholz P; Bagdasarian M; Lanka E (1986). Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* **48** (1), S. 119–131.

Galimand M; Gamper M; Zimmermann A; Haas D (1991). Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173** (5), S. 1598–1606.

Garcia-Rodriguez S; Castilla SA; Machado A; Ayala A (2003). Comparison of methods for sample preparation of individual rat cerebrospinal fluid samples prior to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Biotechnol Lett* **25** (22), S. 1899–1903.

Gavira M; Roldan MD; Castillo F; Moreno-Vivian C (2002). Regulation of nap gene expression and periplasmic nitrate reductase activity in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* DSM158. In: *J Bacteriol* **184** (6), S. 1693–1702.

Geng H; Bruhn JB; Nielsen KF; Gram L; Belas R (2008). Genetic dissection of tropodithietic acid biosynthesis by marine roseobacters. *Appl Environ Microbiol* **74** (5), S. 1535–1545.

- Gentleman RC; Carey VJ; Bates DM; Bolstad B; Dettling M; Dudoit S *et al.* (2004).** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5** (10), S. R80.
- Gilois N; Ramarao N; Bouillaut L; Perchat S; Aymerich S; Nielsen-Leroux C *et al.* (2007).** Growth-related variations in the *Bacillus cereus* secretome. *Proteomics* **7** (10), S. 1719–1728.
- Giovannoni SJ; Stingl U (2005).** Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* **437** (7057), S. 343–348.
- Gohar M; Okstad OA; Gilois N; Sanchis V; Kolsto AB; Lereclus D (2002).** Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2** (6), S. 784–791.
- Gonzalez JM; Kiene RP; Moran MA (1999).** Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **65** (9), S. 3810–3819.
- Goodwin PM; Anthony C (1998).** The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol* **40**, S. 1–80.
- Gram L; Grossart HP; Schlingloff A; Kiorboe T (2002).** Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Appl Environ Microbiol* **68** (8), S. 4111–4116.
- Green J; Bennett B; Jordan P; Ralph ET; Thomson AJ; Guest JR (1996).** Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. *Biochem J* **316** (Pt 3), S. 887–892.
- Grossart HP; Czub G; Simon M (2006).** Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environ Microbiol* **8** (6), S. 1074–1084.
- Hanahan D (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166** (4), S. 557–580.
- Hansen TA; Veldkamp H (1973).** *Rhodopseudomonas sulfidophila*, nov. spec., a new species of the purple nonsulfur bacteria. *Arch Mikrobiol* **92** (1), S. 45–58.
- Hartsock A; Shapleigh JP (2010).** Mechanisms of oxygen inhibition of nirK expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **156** (Pt 10), S. 3158–3165.
- Hashemi FB; Schutze GE; Mason EO Jr (1996).** Discrepancies between results by E-test and standard microbroth dilution testing of *Streptococcus pneumoniae* for susceptibility to vancomycin. *J Clin Microbiol* **34** (6), S. 1546–1547.
- Hayashi M; Unemoto T; Kozuka Y (1970).** Anion-activated 5'-nucleotidase in cell envelopes of a slightly halophilic *Vibrio alginolyticus*. *Biochim Biophys Acta* **220** (2), S. 244–255.
- Hecker M; Schumann W; Volker U (1996).** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19** (3), S. 417–428.

Helmke, E.; Weyland H (1991). Effect of temperature on extracellular enzymes occurring in permanently cold marine environments. *Kieler Meeresforschung ,Sonderheft.* **8**, S. 198–204.

Henderson IR; Navarro-Garcia F; Nataro JP (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6** (9), S. 370–378.

Heurlier K; Thomson MJ; Aziz N; Moir JW (2008). The nitric oxide (NO)-sensing repressor NsrR of *Neisseria meningitidis* has a compact regulon of genes involved in NO synthesis and detoxification. *J Bacteriol* **190** (7), S. 2488–2495.

Hilton JC; Temple CA; Rajagopalan KV (1999). Re-design of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase. Enhancement of adenosine N1-oxide reductase activity. *J Biol Chem* **274** (13), S. 8428–8436.

Hoang TT; Karkhoff-Schweizer RR; Kutchma AJ; Schweizer HP (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212** (1), S. 77–86.

Hollibaugh, J.T; F. Azam (1983). Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnology and Oceanography* **28**, S. 1104–1116.

Hong H; Patel DR; Tamm LK; van den Berg B (2006). The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J Biol Chem* **281** (11), S. 7568–7577.

Hoppe HG (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar Ecol Prog Ser* **11**, S. 299–308.

Hoppe HG; Kim SJ; Gocke K (1988). Microbial Decomposition in Aquatic Environments: Combined Process of Extracellular Enzyme Activity and Substrate Uptake. *Appl Environ Microbiol* **54** (3), S. 784–790.

Hou JP; Poole JW (1969). Kinetics and mechanism of degradation of ampicillin in solution. *J Pharm Sci* **58** (4), S. 447–454.

Howard EC; Henriksen JR; Buchan A; Reisch CR; Burgmann H; Welsh R et al. (2006). Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean. *Science* **314** (5799), S. 649–652.

Inagaki F; Tsunogai U; Suzuki M; Kosaka A; Machiyama H; Takai K et al. (2004). Characterization of C1-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, *mcrA*, and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **70** (12), S. 7445–7455.

Janausch IG; Zientz E; Tran QH; Kroger A; Unden G (2002). C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1553** (1-2), S. 39–56.

Jenkins SG; Birk RJ; Zabransky RJ (1982). Differences in susceptibilities of species of the *Bacteroides fragilis* group to several beta-lactam antibiotics: indole production as an indicator of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **22** (4), S. 628–634.

- Jungst A; Zumft WG (1992).** Interdependence of respiratory NO reduction and nitrite reduction revealed by mutagenesis of *nirQ*, a novel gene in the denitrification gene cluster of *Pseudomonas stutzeri*. *FEBS Lett* **314** (3), S. 308–314.
- Kamada K; Hanaoka F; Burley SK (2003).** Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition. *Mol Cell* **11** (4), S. 875–884.
- Karl DM (2000).** Aquatic ecology. Phosphorus, the staff of life. *Nature* **406** (6791), S. 31, 33.
- Karner, M.; Herndl G J (1992).** Extracellular enzymatic activity and secondary production in free-living and marine snow associated bacteria. *Mar Biol* **113**, S. 341–347.
- Katzke N; Arvani S; Bergmann R; Circolone F; Markert A; Svensson V et al. (2010).** A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr Purif* **69** (2), S. 137–146.
- Keen NT; Tamaki S; Kobayashi D; Trollinger D (1988).** Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70** (1), S. 191–197.
- Kerr MK; Churchill GA (2001).** Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* **2** (2), S. 183–201.
- Khoroshilova N; Popescu C; Munck E; Beinert H; Kiley PJ (1997).** Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (12), S. 6087–6092.
- Kim OB; Reimann J; Lukas H; Schumacher U; Grimpo J; Dunnwald P; Uden G (2009).** Regulation of tartrate metabolism by TtdR and relation to the DcuS-DcuR-regulated C4-dicarboxylate metabolism of *Escherichia coli*. *Microbiology* **155** (Pt 11), S. 3632–3640.
- Kohler T; Curty LK; Barja F; van Delden C; Pechere JC (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182** (21), S. 5990–5996.
- Kolber ZS; Plumley FG; Lang AS; Beatty JT; Blankenship RE; VanDover CL et al. (2001).** Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* **292** (5526), S. 2492–2495.
- Kolber ZS; Van Dover CL; Niederman RA; Falkowski PG (2000).** Bacterial photosynthesis in surface waters of the open ocean. *Nature* **407** (6801), S. 177–179.
- Korner H; Sofia HJ; Zumft WG (2003).** Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27** (5), S. 559–592.
- Kovach ME; Phillips RW; Elzer PH; Roop RM 2nd; Peterson KM (1994).** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16** (5), S. 800–802.
- Kovach ME; Elzer PH; Hill DS; Robertson GT; Farris MA; Roop RM 2nd; Peterson KM (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166** (1), S. 175–176.

- Kulp A; Kuehn MJ (2010).** Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**, S. 163–184.
- Kuwajima G; Kawagishi I; Homma M; Asaka J; Kondo E; Macnab RM (1989).** Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** (13), S. 4953–4957.
- Lang FS; Oesterhelt D (1989).** Gene transfer system for *Rhodopseudomonas viridis*. *J Bacteriol* **171** (8), S. 4425–4435.
- Law CJ; Maloney PC; Wang DN (2008).** Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* **62**, S. 289–305.
- Lazazzera BA; Beinert H; Khoroshilova N; Kennedy MC; Kiley PJ (1996).** DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem* **271** (5), S. 2762–2768.
- Lindquist S; Craig EA (1988).** The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, S. 631–677.
- Loftin KA; Adams CD; Meyer MT; Surampalli R (2008).** Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. *J Environ Qual* **37** (2), S. 378–386.
- Lorenz MG; Wackernagel W (1994).** Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58** (3), S. 563–602.
- Lu CD; Winteler H; Abdelal A; Haas D (1999).** The ArgR regulatory protein, a helper to the anaerobic regulator ANR during transcriptional activation of the *arcD* promoter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181** (8), S. 2459–2464.
- MacLeod RA (1965).** The Question of the Existence of specific Marine Bacteria. *Bacteriol Rev* **29**, S. 9–24.
- MacLeod RA; Onofrey (1956).** Nutrition and metabolism of marine bacteria. II. Observations on the relation of sea water to the growth of marine bacteria. *J Bacteriol* **71** (6), S. 661–667.
- Madler JJ; Lee SH; Haque RU (1976).** Agar plate tests of enhanced sensitivity for detecting biologically active products of staphylococcal filtrates. *Appl Environ Microbiol* **32** (4), S. 575–578.
- Markowitz VM; Kyrpides NC (2007).** Comparative genome analysis in the integrated microbial genomes (IMG) system. *Methods Mol Biol* **395**, S. 35–56.
- Marrs B (1974).** Genetic recombination in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71** (3), S. 971–973.
- Martens T; Heidorn T; Pukall R; Simon M; Tindall BJ; Brinkhoff T (2006).** Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.* 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay *et al.* 1995) Uchino *et al.* 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56** (Pt 6), S. 1293–1304.

- Martens T; Gram L; Grossart HP; Kessler D; Muller R; Simon M *et al.* (2007).** Bacteria of the *Roseobacter* clade show potential for secondary metabolite production. *Microb Ecol* **54** (1), S. 31–42.
- Martinez J; Azam F (1993).** Aminopeptidase activity in marine chroococcoid cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **59** (11), S. 3701–3707.
- Martinez J; Smith DC; Steward DF; Azam F (1996).** Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquatic Microbial Ecology* **10**, S. 223–230.
- Matsushima R; Danno H; Uchida M; Ishihara K; Suzuki T; Kaneniwa M *et al.* (2010).** Analysis of extracellular alginate lyase and its gene from a marine bacterial strain, *Pseudoalteromonas atlantica* AR06. *Appl Environ Microbiol* **86** (2), S. 567–576.
- Mercenier A; Chassy BM (1988).** Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie* **70** (4), S. 503–517.
- Miller JF; Dower WJ; Tompkins LS (1988).** High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (3), S. 856–860.
- Miller L; Kaplan S (1978).** Plasmid transfer and expression in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch Biochem Biophys* **187** (1), S. 229–234.
- Miller TR; Belas R (2006).** Motility is involved in *Silicibacter sp.* TM1040 interaction with dinoflagellates. *Environ Microbiol* **8** (9), S. 1648–1659.
- Milton H; Saier Jr (2006).** Protein Secretion Systems in Gram-negative Bacteria. *Microbe* **1**, S. 414–419.
- Moran MA; Buchan A; Gonzalez JM; Heidelberg JF; Whitman WB; Kiene RP *et al.* (2004).** Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptations to the marine environment. *Nature* **432** (7019), S. 910–913.
- Moran MA; Belas R; Schell MA; Gonzalez JM; Sun F; Sun S *et al.* (2007).** Ecological genomics of marine *Roseobacters*. *Appl Environ Microbiol* **73** (14), S. 4559–4569.
- Moskvina OV; Gilles-Gonzalez MA; Gomelsky M (2010).** The PpaA/AerR regulators of photosynthesis gene expression from anoxygenic phototrophic proteobacteria contain heme-binding SCHIC domains. *J Bacteriol* **192** (19), S. 5253–5256.
- Musidlowska-Persson A; Bornscheuer UT (2003).** Recombinant porcine intestinal carboxylesterase: cloning from the pig liver esterase gene by site-directed mutagenesis, functional expression and characterization. *Protein Eng* **16** (12), S. 1139–1145.
- Namba K; Yamashita I; Vonderviszt F (1989).** Structure of the core and central channel of bacterial flagella. *Nature* **342** (6250), S. 648–654.
- Neumann L; Spinozzi F; Sinibaldi R; Rustichelli F; Pötter M; Steinbüchel A. (2008).** Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *J Bacteriol* **190** (8), S. 2911–2919.
- Newton RJ; Griffin LE; Bowles KM; Meile C; Gifford S; Givens CE *et al.* (2010).** Genome characteristics of a generalist marine bacterial lineage. *ISME J* **4** (6), S. 784–798.

Nickens D; Fry CJ; Ragatz L; Bauer CE; Gest H (1996). Biotype of the purple nonsulfur photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum centenum*. *Arch Microbiol* **165**, S. 91–96.

Novick RP (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* **51** (4), S. 381–395.

Obernesser HJ; Doring G; Botzenhart K (1981). [Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Purification and characterization of two exoproteases (author's transl)]. In: *Zentralbl Bakteriol A* **249** (1), S. 76–88.

Olivera NL; Sequeiros C; Nieves ML (2007). Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub-Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina. *Extremophiles* **11** (3), S. 517–526.

Olmo-Mira MF; Gavira M; Richardson DJ; Castillo F; Moreno-Vivian C; Roldan MD (2004). NapF is a cytoplasmic iron-sulfur protein required for Fe-S cluster assembly in the periplasmic nitrate reductase. *J Biol Chem* **279** (48), S. 49727–49735.

Pemberton JM; Cooke S; Bowen AR (1983). Gene transfer mechanisms among members of the genus *Rhodopseudomonas*. *Ann Microbiol (Paris)* **134B** (1), S. 195–204.

Philippot L; Hojberg O (1999). Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1446** (1-2), S. 1–23.

Piekarski T; Buchholz I; Drepper T; Schobert M; Wagner-Döbler I; Tielen P; Jahn D (2009). Genetic tools for the investigation of *Roseobacter* clade bacteria. *BMC Microbiol* **9**, S. 265.

Pimenta AL; Racher K; Jamieson L; Blight MA; Holland IB (2005). Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *J Bacteriol* **187** (21), S. 7471–7480.

Pocsfalvi G; Cacace G; Cuccurullo M; Serluca G; Sorrentino A; Schlosser G; Blaiotta G; Malorni A. (2008). Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Proteomics* **8** (12), S. 2462–2476.

Popescu CV; Bates DM; Beinert H; Munck E; Kiley PJ (1998). Mossbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (23), S. 13431–13435.

Potter L; Angove H; Richardson D; Cole J (2001). Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* **45**, S. 51–112.

Potter LC; Millington P; Griffiths L; Thomas GH; Cole JA (1999). Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth? *Biochem J* **344** Pt 1, S. 77–84.

Pradella S; Allgaier M; Hoch C; Pauker O; Stackebrandt E; Wagner-Döbler I (2004). Genome organization and localization of the *pufLM* genes of the photosynthesis reaction center in phylogenetically diverse marine *Alphaproteobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **70** (6), S. 3360–3369.

- Pratt D (1963).** Specificity of the solute requirement by marine bacteria on primary isolation from sea-water. *Nature* **199**, S. 1308.
- Preiss J; Ashwell G (1962).** Alginic acid metabolism in bacteria. II. The enzymatic reduction of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid to 2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid. *J Biol Chem* **237**, S. 317–321.
- Priest, F. G. (1984).** Extracellular enzymes. S.5-31. Verlag: American Society for Microbiology, Washington, D.C..
- Quon KC; Marczynski GT; Shapiro L (1996):** Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84** (1), S. 83–93.
- Ramos C; Licht TR; Sternberg C; Krogfelt KA; Molin S (2001).** Monitoring bacterial growth activity in biofilms from laboratory flow chambers, plant rhizosphere, and animal intestine. *Methods Enzymol* **337**, S. 21–42.
- Rayman MK; MacLeod RA (1975).** Interaction of Mg^{2+} with peptidoglycan and its relation to the prevention of lysis of a marine pseudomonad. *J Bacteriol* **122** (2), S. 650–659.
- Richardson DJ (2000).** Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* **146** (Pt 3), S. 551–571.
- Rinaldo S; Giardina G; Brunori M; Cutruzzola F (2005).** N-oxide sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: expression and preliminary characterization of DNR, an FNR-CRP type transcriptional regulator. *Biochem Soc Trans* **33** (Pt 1), S. 184–186.
- Robinson C; Bolhuis A (2004).** Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1694** (1-3), S. 135–147.
- Rosenkrands I; Weldingh K; Jacobsen S; Hansen CV; Florio W; Gianetri I; Andersen P (2000).** Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* **21** (5), S. 935–948.
- Ruiz-Ponte C; Cilia V; Lambert C; Nicolas JL (1998).** *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearings and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int J Syst Bacteriol* **48** Pt 2, S. 537–542.
- Rupp M; Gorisch H (1988).** Purification, crystallisation and characterization of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **369** (6), S. 431–439.
- Sambrook, John J.; Russell, David W. (2001).** Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh T; Hoshino Y; Kitamura H (1976).** *Rhodopseudomonas sphaeroides forma sp. denitrificans*, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Arch Microbiol* **108** (3), S. 265–269.
- Schneider KH; Giffhorn F; Kaplan S (1993).** Cloning, nucleotide sequence and characterization of the mannitol dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*. *J Gen Microbiol* **139** (10), S. 2475–2484.

- Schobert M; Tielen P (2010).** Contribution of oxygen-limiting conditions to persistent infection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol* **5** (4), S. 603–621.
- Scholz P, Haring V. Wittmann-Liebold B. Ashman K. Bagdasarian M. Scherzinger E. (1989).** Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*. **75**, S. 271–288.
- Schreiber K; Boes N; Eschbach M; Jaensch L; Wehland J; Bjarnsholt T *et al.* (2006).** Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. *J Bacteriol* **188** (2), S. 659–668.
- Schwalbach, M. und Fuhrman JAS (2005).** Wide-ranging abundances of Aerobic, Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence and Quantitative PCR. *Limnol. Oceanogr* **50**, S. 620–628.
- Schwartz MA; Hayton WL (1972).** Relative stability of hetacillin and ampicillin in solution. *J Pharm Sci* **61** (6), S. 906–909.
- Schweizer H (2008).** Bacterial genetics: past achievements, present state of the field, and future challenges. *Biotechniques* **44** (5), S. 633–4, 636–41.
- Schweizer HP, Klassen TR Hoang T. (Hg.) (1996).** Improved methods for gene analysis in *Pseudomonas*. Unter Mitarbeit von Furukawa K. Haas D. Silver S. editor Nakazawa T: ASM Press Washington (Molecular Biology of Pseudomonads).
- Sears HJ; Sawers G; Berks BC; Ferguson SJ; Richardson DJ (2000).** Control of periplasmic nitrate reductase gene expression (*napEDABC*) from *Paracoccus pantotrophus* in response to oxygen and carbon substrates. *Microbiology* **146** (Pt 11), S. 2977–2985.
- Sebastian M; Ammerman JW (2009).** The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA. *ISME J* **3** (5), S. 563–572.
- Senior PJ; Dawes EA (1973).** The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* **134** (1), S. 225–238.
- Sepandj F; Ceri H; Gibb A; Read R; Olson M (2007).** Minimum inhibitory concentration versus minimum biofilm eliminating concentration in evaluation of antibiotic sensitivity of *enterococci* causing peritonitis. *Perit Dial Int* **27** (4), S. 464–465.
- Shapleigh, JP.** Dissimilatory and Assimilatory Nitrate Reduction in the Purple Photosynthetic Bacteria, Springer Verlag, S. 623–642.
- Shiba T (1991).** *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink-pigmented bacteria which contain bacteriochlorophyll *a*. *Syst Appl Microbiol* **14**, S. 140–145.
- Simpson DM; Beynon RJ (2010).** Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. *J Proteome Res* **9** (1), S. 444–450.
- Sistrom WR (1977).** Transfer of chromosomal genes mediated by plasmid r68.45 in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *J Bacteriol* **131** (2), S. 526–532.
- Six S; Andrews SC; Unden G; Guest JR (1994).** *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). *J Bacteriol* **176** (21), S. 6470–6478.

- Skerker JM; Shapiro L (2000).** Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.* **19** (13), S. 3223–3234.
- Smith DC; Simon M; Alldrege AL; Azam F (1992).** Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* **359**, S. 139–142.
- Somville M und Billen G (1983).** A method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnology and Oceanography* **28**: (1), S. 190–193.
- Staskawicz B; Dahlbeck D; Keen N; Napoli C (1987).** Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169** (12), S. 5789–5794.
- Steunou AS; Jensen SI; Brecht E; Becraft ED; Bateson MM; Kilian O et al. (2008).** Regulation of *nif* gene expression and the energetics of N₂ fixation over the diel cycle in a hot spring microbial mat. *ISME J* **2** (4), S. 364–378.
- Sutton VR; Mettert EL; Beinert H; Kiley PJ (2004).** Kinetic analysis of the oxidative conversion of the [4Fe-4S]²⁺ cluster of FNR to a [2Fe-2S]²⁺ Cluster. *J Bacteriol* **186** (23), S. 8018–8025.
- Tabata A, Yamamoto I, Matsuzaki M, Satoh T. (2005).** Differential regulation of periplasmic nitrate reductase gene (*napKEFDABC*) expression between aerobiosis and anaerobiosis with nitrate in a denitrifying phototroph *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *Denitrificans*. *Arch Microbiol.* **184** (2), S. 108–116.
- Thoma S; Schobert M (2009).** An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. *FEMS Microbiol Lett* **294** (2), S. 127–132.
- Thompson J; Green ML; Happold FC (1969).** Cation-activated nucleotidase in cell envelopes of a marine bacterium. *J Bacteriol* **99** (3), S. 834–841.
- Tjalsma H; Antelmann H; Jongbloed JD; Braun PG; Darmon E; Dorenbos R et al. (2004).** Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **68** (2), S. 207–233.
- Tracy M; Wanahita A; Shuhatovich Y; Goldsmith EA; Clarridge JE 3rd; Musher DM (2001).** Antibiotic susceptibilities of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrob Agents Chemother* **45** (5), S. 1511–1514.
- Tseng TT; Tyler BM; Setubal JC (2009).** Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9** Suppl 1, S. S2.
- Tyler ME; Bielling MC; Pratt DB (1960).** Mineral requirements and other characters of selected marine bacteria. *J Gen Microbiol* **23**, S. 153–161.
- Unden G; Schirawski J (1997).** The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. *Mol Microbiol* **25** (2), S. 205–210.
- Unemoto T; Hayashi M (1977).** Na⁺-dependent activation of NADH oxidase in membrane fractions from halophilic *Vibrio alginolyticus* and *V. costicola*. *J Biochem* **82** (5), S. 1389–1395.

- Vander Wauven C; Pierard A; Kley-Raymann M; Haas D (1984).** *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* **160** (3), S. 928–934.
- Vetting MW; Hegde SS; Fajardo JE; Fiser A; Roderick SL; Takiff HE; Blanchard JS (2006).** Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* **45** (1), S. 1–10.
- Waechter-Brulla D; DiSpirito AA; Chistoserdova LV; Lidstrom ME (1993).** Methanol oxidation genes in the marine methanotroph *Methylomonas* sp. strain A4. *J Bacteriol* **175** (12), S. 3767–3775.
- Wagner-Döbler I; Thiel V; Eberl L; Allgaier M; Bodor A; Meyer S et al. (2005).** Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine *alphaproteobacteria*. *Chembiochem* **6** (12), S. 2195–2206.
- Wagner-Döbler I; Rheims H; Felske A; El-Ghezal A; Flade-Schroder D; Laatsch H et al. (2004).** *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a North Sea alphaproteobacterium that produces bioactive metabolites. *Int J Syst Evol Microbiol* **54** (Pt 4), S. 1177–1184.
- Wagner-Döbler I; Ballhausen B; Berger M; Brinkhoff T; Buchholz I; Bunk B et al. (2010).** The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *ISME J* **4** (1), S. 61–77.
- Wagner-Döbler I; Biebl H (2006).** Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage. *Annu Rev Microbiol* **60**, S. 255–280.
- Wallace RJ; Steele LC; Sumter G; Smith JM (1988).** Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother* **32** (12), S. 1776–1779.
- Watt SA; Wilke A; Patschkowski T; Niehaus K (2005).** Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics* **5** (1), S. 153–167.
- Weissbach A; Hurwitz J (1959).** The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification. *J Biol Chem* **234** (4), S. 705–709.
- Wirth R; Friesenegger A; Fiedler S (1989).** Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* **216** (1), S. 175–177.
- Woese CR; Stackebrandt E; Weisburg WG; Paster BJ; Madigan MT; Fowler VJ et al. (1984).** The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Syst Appl Microbiol* **5**, S. 315–326.
- Wu J; Sunda W; Boyle EA; Karl DM (2000).** Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. *Science* **289** (5480), S. 759–762.
- Wunsch P; Zumft WG (2005).** Functional domains of NosR, a novel transmembrane iron-sulfur flavoprotein necessary for nitrous oxide respiration. *J Bacteriol* **187** (6), S. 1992–2001.
- Xavier T; Ganesan TS; Menon KN (2010).** A simple and efficient method for processing of cell lysates for two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **31** (14), S. 2429–2435.

- Yang YH; Paquet AC (2005).** Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Preprocessing Two-Color Spotted Array. *Springer New York*, S. 49–69.
- Yurkov V, Gernerden H. (1993).** Abundance and salt tolerance of obligately aerobic, phototrophic bacteria in a microbial mat. *Neth J Sea Res* **31**, S. 57–62.
- Yurkov VV; Beatty JT (1998).** Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62** (3), S. 695–724.
- Zhou MY; Chen XL; Zhao HL; Dang HY; Luan XW; Zhang XY et al. (2009).** Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China sea. *Microb Ecol* **58** (3), S. 582–590.
- Zientz E; Bongaerts J; Uden G (1998).** Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system. *J Bacteriol* **180** (20), S. 5421–5425.
- Ziervogel K; Arnosti C (2008).** Polysaccharide hydrolysis in aggregates and free enzyme activity in aggregate-free seawater from the north-eastern Gulf of Mexico. *Environ Microbiol* **10** (2), S. 289–299.
- Zumft WG (1997).** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61** (4), S. 533–616.
- Zumft WG (2005).** Biogenesis of the bacterial respiratory CuA, Cu-S enzyme nitrous oxide reductase. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10** (2-4), S. 154–166.

8 Danksagung

Viele Leute haben mich die letzten Jahre begleitet und mir unterstützend zur Seite gestanden. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich dafür bedanken:

Prof. Dr. Dieter Jahn für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema unter hervorragenden Bedingungen arbeiten zu können,

PD Dr.-Ing. Max Schobert für die Übernahme des Koreferats. Darüber hinaus aber auch für viele hilfreiche Anregungen und Tipps, sowie das ein oder andere Kontrollexperiment,

Prof. Dr. Christoph Wittmann für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Petra Tielen, für eine Betreuung die ich mir nicht besser hätte vorstellen können, das Talent mich immer wieder aufs Neue für das Thema zu begeistern und nicht zu vergessen der unermüdliche Einsatz während der gesamten Schreiberei.

PD Dr. Manfred Rhode danke ich sehr für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ina Buchholz und Jürgen Tomasch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Wagner-Döbler sei herzlichst gedankt für die zur Verfügung gestellten Kulturüberstände sowie die initiale Hilfe bei den Microarray-Versuchen.

Bei Dr. Johannes Klein bedanke ich mich für die Hilfe bei der Auswertung der Microarrays. Ebenso gedankt sei Dr. Boyke Bunk für die Hilfe bei vielen kleinen und großen Fragen rund um das Thema Arrays. Nicht unerwähnt bleiben darf die Hilfe von Matthias Ebert bei der Auswertung der „Rohdaten“.

All meinen Lieben, Dr. Anika March, Dr. Claudia Schulz, Dr. Einhorn, Dr. Ines Gruner, Isam Haddad, Franziska Schuller, Nadine Nachtigall, Melanie Burghartz, Dr.-Ing. Niesel, Dr. Rebekka Biedendieck, Dr. Sabrina Thoma, Sarah Borg und Sebastian Laaß sei gedankt für eine unvergessliche Zeit, die viele Hilfe nicht nur in den letzten Monaten sondern über die ganzen Jahre, außergewöhnliche Formulator-Fähigkeiten, emsiges Korrektur lesen, das Ertragen einer gewissen Angspanntheit während der letzten Monate und unzählige gelungene Ablenkungsmanöver.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Jahn sowie der AG Tielen im Besonderen, für eine Arbeitsatmosphäre in der das Arbeiten sehr viel Spaß gemacht hat.

Nicht zu vergessen ein Dank an all meine Freunde außerhalb des Mikrokosmos Biozentrum, die mich ab und zu daran erinnern haben dass es da draußen auch noch ein Leben gibt. Auch für ihr Verständnis und ihre aufmunternden Worte in den letzten Monaten ein herzliches Dankeschön.

Zum Schluß möchte ich meiner Familie, ganz Besonders meiner Mutter danken, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

9 Anhang

Im Anhang befinden sich die Tabellen A-1, A-2, A-3, A-4 und A-5 in denen die Daten der Microarray-Analysen zu finden sind.

Tabelle A-1. Regulierte Gene in *D. shibae* unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat unter Lichtausschluss. Beschrieben sind der Genlocus sowie dessen Genname, sofern vergeben. Weiterhin aufgeführt ist das jeweilige Genprodukt sowie der Faktor der Genexpressionsänderung, der *Fold Change* (FC). Als Grenzwert für die differentielle Expression eines Gens wurde ein FC von $\pm 2,6$ festgelegt. Zusätzlich aufgeführt sind einige Gene, deren FC unter diesem Grenzwert lag, wenn die von ihnen kodierten Proteine in ihrer Funktion in Kontext mit signifikant regulierten Genen standen. Hierbei betrug der FC jedoch niemals weniger als 2,0. Gene, deren Promotoren eine Fnr-Bindestelle besitzen, sind grau unterlegt.

Genlocus	Genname	Genprodukt	FC
Denitrifikation			
Dshi_2303		Protein der NnrS Familie	2,6
Dshi_2304		Protein mit Hemerythin HHE Kationen-Bindedomäne, vermutlich NO-abhängiger Regulator DnrN oder NorA	4,2
Dshi_3165	<i>napA</i>	Periplasmatische Nitratreduktase, katalytische Untereinheit	-2,9
Dshi_3166	<i>napD</i>	Periplasmatische Nitratreduktase	-3,2
Dshi_3167	<i>napF</i>	Periplasmatische Nitratreduktase, Ferredoxin-Typ Protein NapF	-3,6
Dshi_3168	<i>nosX</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich NosX: Protein für die Reifung der N ₂ O-Reduktase	5,5
Dshi_3169	<i>cycA</i>	Cytochrom <i>c</i> , Klasse I	16,0
Dshi_3170	<i>nmrU</i>	Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit NnrU	3,2
Dshi_3171	<i>cbiX</i>	Cobalamin Biosynthese	4,2
Dshi_3172	<i>nirN</i>	Cytochrom <i>d₁</i> , besitzt Häm-Binde Region	4,8
Dshi_3173	<i>nirJ</i>	Radical SAM Domäne-tragendes Protein	4,6
Dshi_3174	<i>nirH</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,1
Dshi_3175	<i>nirG</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	5,1
Dshi_3176	<i>nirD</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,4
Dshi_3177	<i>nirF</i>	Cytochrom <i>d₁</i> Häm-Region	6,5
Dshi_3178	<i>nirC</i>	Hypothetisches Protein, putative Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase	6,5
Dshi_3179	<i>nirE</i>	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	7,5
Dshi_3180	<i>nirS</i>	Cytochrom <i>cd₁</i> Nitritreduktase	21,6
Dshi_3181	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der N ₂ O-Reduktase	3,2

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Denitrifikation			
Dshi_3182	<i>nnrS</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich an NO-Abbau beteiligtes Protein NnrS	3,7
Dshi_3183	<i>norC</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, kleine Untereinheit	14,1
Dshi_3184	<i>norB</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase	12,6
Dshi_3185	<i>norQ</i>	ATPase	10,0
Dshi_3186	<i>norD</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, Aktivierungsprotein	12,6
Dshi_3187	<i>norE</i>	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit III	2,9
Dshi_3188	<i>norF</i>	Putatives NO-Reduktase Protein NorF	2,6
Dshi_3189	<i>dnrD</i>	Transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	2,0
Dshi_3191	<i>dnr</i>	Transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	4,3
Dshi_3192		Hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>nos</i> -Cluster	5,2
Dshi_3193	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	3,3
Dshi_3194	<i>nosZ</i>	Distickstoffmonoxid-Reduktase	9,1
Dshi_3195	<i>nosD</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifungsprotein NosD, periplasmatisches Cu ²⁺ -Bindeprotein	2,4
Dshi_3196	<i>nosF</i>	ABC-Transporter zugehörig	2,4
Dshi_3197	<i>nosY</i>	NO-Reduktase Protein NosY, ABC-Transporter zugehörig	2,5
Dshi_3198	<i>nosL</i>	Protein der NosL Familie	2,6
Dshi_3199	<i>nosX</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifung NosX	2,3
Arginin-Fermentation			
Dshi_0431	<i>arcD</i>	Anaerober Arginin-Ornithin-Antiporter	3,7
Dshi_0432	<i>arcA</i>	Arginin-Deaminase	5,8
Dshi_0433	<i>arcB</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	4,4
Dshi_0434	<i>arcC</i>	Carbamat-Kinase	3,1

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Porphyrin und Chlorophyll Metabolismus			
Dshi_0161	<i>cbtA</i>	Cobalt-Transporter, Untereinheit CbtA	3,2
Dshi_0162	<i>cbtB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Cobalt-Transporter, Untereinheit CbtB	2,6
Dshi_0541	<i>hemN1</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	3,0
Dshi_0659	<i>hemN2</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	2,1
Dshi_3190	<i>hemA</i>	5-Aminolävulinatsynthase	7,0
Transport			
Dshi_0390	<i>rbsB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Zucker ABC Transporter, periplasmatisches Bindeprotein	-3,4
Dshi_0547	<i>ugpB</i>	Extrazelluläres Solut-Bindeprotein	-2,9
Dshi_0974		Sorbitol/Mannitol ABC-Transporter, periplasmatisches Bindeprotein	-2,6
Dshi_1089		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,0
Dshi_1090		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctQ	-2,4
Dshi_1194		TRAP Transporter, 4 TM / 12 TM Fusionsprotein	-3,9
Dshi_1195		TRAP Transporter Solut Rezeptor	-7,8
Dshi_1663		Nitrat ABC-Transporter Nitrat-Bindeprotein	2,9
Dshi_2014	<i>ugpB</i>	Carbohydrat ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-4,1
Dshi_2343		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	-5,0
Dshi_2662		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-5,1
Dshi_2664		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-4,9
Dshi_2667		ABC-Transporter zugehörig	-5,8
Dshi_2670		ABC-Transporter zugehörig	-2,6
Dshi_2671		ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-2,7
Dshi_3003		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,1
Dshi_3153		Hypothetisches Protein, vermutlich TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	4,8

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Transport			
Dshi_3154		Hypothetisches Protein, vermutlich TRAP Dicarboxylat Transporter, Transmembranprotein DctQ	4,8
Dshi_3155		Hypothetisches Protein, vermutlich TRAP Dicarboxylat Transporter DctM Untereinheit	2,2
Dshi_3326		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,0
Dshi_3711		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,1
Stressantwort			
Dshi_0683		Hitzeschockprotein Hsp 20	2,3
Dshi_0769	<i>csp</i>	Kälteschockprotein, besitzt DNA-Bindedomäne	3,7
Dshi_1299	<i>ompW</i>	Außenmembranprotein, OmpW-Familie	3,0
Dshi_1338	<i>uspA</i>	UspA-Domäne tragendes Protein	3,3
Dshi_1807		UspA-Domäne tragendes Protein	2,2
Dshi_2213		UspA-Domäne tragendes Protein	2,8
Dshi_2796		Hitzeschockprotein Hsp 20	6,8
Dshi_2892		Hitzeschockprotein Hsp 20	3,7
regulatorische Proteine			
Dshi_0072	<i>rsbW</i>	Putativer Anti-Sigma Regulationsfaktor, Serin/Threonin Proteinkinase	-3,2
Dshi_0212		Transkriptioneller Regulator ChvI, Zwei-Komponentensystem	-3,0
Dshi_0765		Transkriptioneller Regulator, MarR Familie	-5,2
Dshi_1094		Transkriptioneller Regulator, Fis Familie	-2,7
Dshi_1411		Transkriptioneller Regulator, TraR/DksA Familie	3,8
Dshi_1508	<i>ctrA</i>	Transkriptioneller Regulator, Zwei-Komponentensystem	-8,5
Dshi_2631		Antwortregulator, Empfänger Domäne	-3,5
Dshi_2674		Transkriptioneller Regulator, Zwei-Komponentensystem, LuxR Familie	-3,3
Dshi_2775		Transkriptioneller Regulator, XRE Familie	2,8

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung regulatorische Proteine			
Dshi_2820		Antwortregulator, Empfänger Domäne	-4,7
Dshi_2852		Transkriptioneller Regulator, LuxR Familie	-5,6
Dshi_4067		Hypothetisches Protein, vermutlich AHL-abhängiger transkriptioneller Regulator, LuxR Familie	-2,7
PHB-Synthese			
Dshi_2231	<i>phaP</i>	Phasin	2,6
Dshi_2233	<i>phbC</i>	Poly(β)-Hydroxybutyrat Polymerase	2,9
Dshi_3066	<i>atoB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Acetyl-CoA Acetyltransferase	2,8
Dshi_3067	<i>fabG</i>	Acetoacetyl-CoA Reduktase	2,9
Motilität und Chemotaxis			
Dshi_1131	<i>flp</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin Flp	-5,8
Dshi_1132	<i>flp</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin Flp	-6,6
Dshi_3254	<i>flgH</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares L-Ring Protein FlgH	-3,3
Dshi_3250	<i>fliQ</i>	Exportprotein FliQ	-2,6
Dshi_3252	<i>flgG</i>	Flagellen-Basalkörperprotein FlgG	-2,8
Dshi_3255	<i>fliL</i>	Flagellen-Basalkörper-assoziiertes Protein FliL	-2,7
Dshi_3260	<i>motA</i>	Flagellen Motorprotein MotA	-3,0
Dshi_3261	<i>flbB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares Protein FlbB	-2,8
Dshi_3265	<i>fliH</i>	Putatives Flagellen-Biosynthese Protein FliH	-2,9
Dshi_3359	<i>flbT</i>	Repressor der Flagellen-Biosynthese FlbT	-2,7
Dshi_3360	<i>flaF</i>	Regulatorisches Protein der Flagellen-Biosynthese FlaF	-3,3
Dshi_3361	<i>fliC</i>	Flagellin Protein FliC	-5,4
Dshi_3378	<i>flgK</i>	Flagellen Haken-assoziiertes Protein FlgK	-3,1
Dshi_3379	<i>flgE</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellen Hakenprotein FlgE	-4,6

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Motilität und Chemotaxis			
Dshi_3484		Hypothetisches Protein, vermutlich an Chemotaxis beteiligte Histidinkinase	-2,7
Translation			
Dshi_0246	<i>rpsU</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S21	-2,7
Dshi_0260	<i>rplK</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L11	-3,2
Dshi_0265	<i>rplJ</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L10	-5,8
Dshi_0266	<i>rplL</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L7/L12	-9,3
Dshi_0271	<i>rpsL</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S12	-3,8
Dshi_0272	<i>rpsG</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S7	-3,2
Dshi_0273	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	-4,0
Dshi_0275	<i>rpsJ</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S10	-3,9
Dshi_0276	<i>rplC</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L3	-2,7
Dshi_0277	<i>rplD</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L4	-4,3
Dshi_0278	<i>rplW</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L23	-4,1
Dshi_0285	<i>rplB</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L2	-3,3
Dshi_0286	<i>rpsS</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S19	-3,8
Dshi_0287	<i>rplV</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L22	-5,2
Dshi_0289	<i>rplP</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L16	-2,7
Dshi_0296	<i>rplX</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L24	-3,6
Dshi_0297	<i>rplE</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L5	-5,9
Dshi_0298	<i>rpsN</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S14	-4,3
Dshi_0299	<i>rpsH</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S8	-3,9
Dshi_0301	<i>rplR</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L18	-3,5
Dshi_0302	<i>rpsE</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S5	-2,8

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Translation			
Dshi_0303	<i>rpmD</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L30	-3,3
Dshi_0304	<i>rplO</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L15	-2,9
Dshi_0348	<i>rpsP</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S16	-3,7
Dshi_1549	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts	-3,6
Dshi_1601	<i>rpsI</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S9	-3,0
Dshi_1602	<i>rplM</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L13	-3,6
Dshi_2186	<i>rpsF</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S6	-2,7
Dshi_2187	<i>rpsR</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S18	-4,0
Dshi_2188	<i>rplI</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L9	-3,1
Dshi_2919	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	-3,6
Dshi_2920		Chaperonin Cpn10	-3,0
Dshi_2994	<i>rpsO</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S15	-2,8
Elektronentransportkette			
Dshi_0476	<i>gcd</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich PQQ-abhängige Methanol-Dehydrogenase, große Untereinheit	-5,0
Dshi_0948	<i>lldD</i>	L-Lactat-Dehydrogenase	-2,6
Dshi_2663		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i> ₅₅₀	-11,9
Dshi_2673		Quinoprotein Alkoholdehydrogenase, PQQ-abhängig	-12,8
Dshi_2688		Cytochrom <i>bd</i> Ubiquinol Oxidase Untereinheit I	3,0
Dshi_2982		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i>	-2,7
Dshi_3276		Cytochrom <i>c</i> ₁ Untereinheit	2,0
Dshi_3547		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i> ₂	-3,3

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
TypIV Pilus/Sekretion			
Dshi_3638		Lytische katalytische Transglykolase	-3,7
Dshi_3639	<i>virB2</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilus-Untereinheit des TypIV-Sekretionssystems	-5,0
Dshi_3641	<i>virB4</i>	VirB Komponente des TypIV-Sekretionssystems	-5,7
Dshi_3642		Hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>vir</i> -Cluster	-3,0
Dshi_3643		Hypothetisches Protein, vermutlich lytische, katalytische Transglykolase, lokalisiert in <i>vir</i> -Cluster	-3,0
Dshi_3644	<i>virB5</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin des TypIV-Sekretionssystems	-3,9
Dshi_3646	<i>virB9</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Bestandteil des TypIV-Sekretionskanals	-2,9
Dshi_3972		Hypothetisches Protein,, lokalisiert in <i>vir</i> -Cluster	-4,6
Dshi_3974	<i>virB2</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilus-Untereinheit des TypIV-Sekretionssystems	-5,4
Dshi_3975	<i>virB3</i>	Bestandteil des TypIV-Sekretionskanals	-3,4
Dshi_3976	<i>virB2</i>	VirB Komponente des TypIV-Sekretionssystems	-4,4
Dshi_3979	<i>virB5</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin des TypIV-Sekretionssystems	-4,2
Sonstige			
Dshi_0048		Hypothetisches Protein, vermutlich Histidinkinase BaeS	-3,8
Dshi_0073		Anti-Sigmafaktor Antagonist	-2,9
Dshi_0473		S-(Hydroxymethyl)-Glutathion-Dehydrogenase	-3,4
Dshi_0474		S-Formylglutathion-Hydrolase	-2,7
Dshi_0617	<i>clpB</i>	ATPase	3,0
Dshi_0739		Ppx/GppA Phosphatase	2,7
Dshi_1095		Aldehyddehydrogenase	-4,4
Dshi_1785	<i>nrdJ</i>	Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase, Untereinheit α	-3,1
Dshi_2285		Hypothetisches Protein, vermutlich Lipoprotein	2,7
Dshi_2340		Ribonuklease	-3,4

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Sonstige			
Dshi_2367	<i>algP</i>	Alginat, regulatorisches Protein AlgP	3,7
Dshi_2368	<i>ureB</i>	Urease, β -Untereinheit	3,4
Dshi_2388		Glykosyltransferase	-2,9
Dshi_2658		Molybdopterin-Dehydrogenase	-6,9
Dshi_2659	<i>coxL</i>	CO-Dehydrogenase, große Untereinheit	-9,5
Dshi_2660	<i>coxS</i>	CO-Dehydrogenase, kleine Untereinheit	-7,3
Dshi_2661		CO-Dehydrogenase, Untereinheit G	-3,4
Dshi_3236	<i>cynT</i>	Carbonat-Dehydratase	3,0
Dshi_3402		Serralysin	-3,4
Dshi_3433		Hypothetisches Protein, PAS-Familie, vermutlich interner Sauerstoffsensor	-4,2
Dshi_3500	<i>comF</i>	Hypothetisches Protein, putatives Kompetenzprotein F	-2,7
Dshi_3532	<i>ppaA</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Sauerstoff-und Lichtsensor PpaA	-2,7
Dshi_3841	<i>gdhA</i>	Glutamatdehydrogenase	-3,2
Dshi_3877	<i>thiC</i>	Protein der Thiamin-Biosynthese	-4,1
Unbekannt			
Dshi_0022		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_0225		Hypothetisches Protein, vermutlich Antwortregulator, Empfängerdomäne	4,1
Dshi_0429		Hypothetisches Protein	8,3
Dshi_0430		Hypothetisches Protein	5,4
Dshi_0438		Hypothetisches Protein	3,0
Dshi_0486		Hypothetisches Protein	-3,1
Dshi_0715		Hypothetisches Protein	3,7
Dshi_0750		Hypothetisches Protein	3,1

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_0818		Hypothetisches Protein	4,6
Dshi_0854		Hypothetisches Protein	-4,8
Dshi_1205		Hypothetisches Protein	3,5
Dshi_1364		Hypothetisches Protein	-2,8
Dshi_1412		Hypothetisches Protein	4,1
Dshi_1470		Hypothetisches Protein	-3,2
Dshi_1560		Hypothetisches Protein	4,3
Dshi_1584		Hypothetisches Protein	-2,9
Dshi_1748		Hypothetisches Protein	3,6
Dshi_2085		Hypothetisches Protein	-5,4
Dshi_2308		Hypothetisches Protein	2,6
Dshi_2364		Hypothetisches Protein	4,3
Dshi_2617		Hypothetisches Protein	-2,8
Dshi_2621		Hypothetisches Protein	3,4
Dshi_2622		Hypothetisches Protein	3,0
Dshi_2634		Hypothetisches Protein	-5,7
Dshi_2665		Hypothetisches Protein	-9,0
Dshi_2666		Hypothetisches Protein	-10,2
Dshi_2746		Hypothetisches Protein	4,1
Dshi_3152		Hypothetisches Protein	2,8
Dshi_3156		Hypothetisches Protein	2,8
Dshi_3312		Hypothetisches Protein	-5,7
Dshi_3636		Hypothetisches Protein	-3,3

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_3637		Hypothetisches Protein	-5,4
Dshi_3666		Hypothetisches Protein	3,0
Dshi_3966		Hypothetisches Protein	-2,8
Dshi_4130		Hypothetisches Protein	-2,6
Dshi_4154		Hypothetisches Protein, vermutlich Metallo- β -Lactamase Familie	-3,3
Dshi_4155		Hypothetisches Protein	-4,1

Tabelle A-2. Regulierte Gene in *D. shibae* unter denitrifizierenden Bedingungen mit 25 mM Nitrat und einer definierten Menge Licht. Beschrieben sind der Genlokus sowie dessen Genname, sofern vergeben. Weiterhin aufgeführt ist das jeweilige Genprodukt sowie der Faktor der Genexpressionsänderung, der *Fold Change* (FC). Als Grenzwert für die differentielle Expression eines Gens wurde ein FC von $\pm 2,6$ festgelegt. Zusätzlich aufgeführt sind einige Gene, deren FC unter diesem Grenzwert lag, wenn die von ihnen kodierten Proteine in ihrer Funktion in Kontext mit signifikant regulierten Genen standen. Hierbei betrug der FC jedoch niemals weniger als 2,0. Gene, deren Promotoren eine Fnr-Bindestelle besitzen, sind grau unterlegt.

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Denitrifikation			
Dshi_2303		Protein der NnrS Familie	2,8
Dshi_2304		Protein mit Hemerythin HHE Kationen-Bindedomäne, vermutlich NO-abhängiger Regulator DnrN oder NorA	5,7
Dshi_3165	<i>napA</i>	Periplasmatische Nitratreduktase, katalytische Untereinheit	-2,5
Dshi_3166	<i>napD</i>	Periplasmatische Nitratreduktase	-2,1
Dshi_3167	<i>napF</i>	Periplasmatische Nitratreduktase, Ferredoxin-Typ Protein NapF	-2,2
Dshi_3168	<i>nosX</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich NoxX: Protein für die Reifung der N ₂ O-Reduktase	9,5
Dshi_3169	<i>cycA</i>	Cytochrom <i>c</i> , Klasse I	24,9
Dshi_3170	<i>nnrU</i>	Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit NnrU	3,3
Dshi_3171	<i>cbiX</i>	Cobalmin Biosynthese	6,8
Dshi_3172	<i>nirN</i>	Cytochrom <i>d₁</i> , besitzt Häm-Binderegion	10,2
Dshi_3173	<i>nirJ</i>	Radical SAM-Domäne-tragendes Protein	10,3
Dshi_3174	<i>nirH</i>	Transkriptioneller Regulator, AcnC Familie	9,1
Dshi_3175	<i>nirG</i>	Transkriptioneller Regulator, AcnC Familie	8,1
Dshi_3176	<i>nirD</i>	Transkriptioneller Regulator, AcnC Familie	7,2
Dshi_3177	<i>nirF</i>	Cytochrom <i>d₁</i> Häm-Region	13,2
Dshi_3178	<i>nirC</i>	Hypothetisches Protein, putative Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase	8,7
Dshi_3179	<i>nirE</i>	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	16,6
Dshi_3180	<i>nirS</i>	Cytochrom <i>cd₁</i> Nitritreduktase	29,9
Dshi_3181	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der N ₂ O-Reduktase	6,6
Dshi_3182	<i>nnrS</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich an NO-Abbau beteiligtes Protein NnrS	9,3

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Denitrifikation			
Dshi_3183	<i>norC</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, kleine Untereinheit	31,1
Dshi_3184	<i>norB</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase	25,8
Dshi_3185	<i>norQ</i>	ATPase	15,8
Dshi_3186	<i>norD</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, Aktivierungsprotein	16,8
Dshi_3187	<i>norE</i>	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit III	3,8
Dshi_3188	<i>norF</i>	Putatives NO-Reduktase Protein NorF	2,8
Dshi_3189	<i>dnrD</i>	Transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	3,3
Dshi_3191	<i>dnr</i>	Transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	6,0
Dshi_3192		Hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>nos</i> -Cluster	10,9
Dshi_3193	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	4,5
Dshi_3194	<i>nosZ</i>	Distickstoffmonoxid-Reduktase	14,9
Dshi_3195	<i>nosD</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifungsprotein NosD, periplasmatisches Cu ²⁺ -Bindepotein	4,1
Dshi_3196	<i>nosF</i>	ABC-Transporter zugehörig	3,7
Dshi_3197	<i>nosY</i>	NO-Reduktase Protein NosY, ABC-Transporter zugehörig	2,7
Dshi_3198	<i>nosL</i>	Protein der NosL Familie	2,4
Dshi_3199	<i>nosX</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifung NosX	2,6
Arginin-Fermentation			
Dshi_0431	<i>arcD</i>	Anaerober Arginin-Ornithin-Antiporter	5,4
Dshi_0432	<i>arcA</i>	Arginin-Deiminase	8,1
Dshi_0433	<i>arcB</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	6,1
Dshi_0434	<i>arcC</i>	Carbamat-Kinase	2,9

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Porphyrin und Chlorophyll Metabolismus			
Dshi_0161	<i>cbtA</i>	Cobalt-Transporter, Untereinheit CbtA	3,3
Dshi_0162	<i>cbtB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Cobalt-Transporter, Untereinheit CbtB	4,2
Dshi_0541	<i>hemN1</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	4,9
Dshi_0659	<i>hemN2</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	3,4
Dshi_1155	<i>cysG</i>	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	2,9
Dshi_3190	<i>hemA</i>	5-Aminolävulinatsynthase	7,4
Transport			
Dshi_0390	<i>rbsB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Zucker ABC Transporter, periplasmatisches Bindeprotein	-3,4
Dshi_0542		Phosphattransporter	3,2
Dshi_0547	<i>ugpB</i>	Extrazelluläres Solut-Bindeprotein	-3,7
Dshi_0974		Sorbitol/Mannitol ABC-Transporter, periplasmatisches Bindeprotein	-3,3
Dshi_1089		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,7
Dshi_1090		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctQ	-2,3
Dshi_1194		TRAP Transporter, 4 TM / 12 TM Fusionsprotein	-3,6
Dshi_1195		TRAP Transporter Solut Rezeptor	-4,9
Dshi_1477		Protein der Usg Familie	3,5
Dshi_1663		Nitrat ABC-Transporter Nitrat-Bindeprotein	2,5
Dshi_1704	<i>znuA</i>	Zink ABC-Transporter, periplasmatisches Bindeprotein ZnuA	2,7
Dshi_1924		TRAP Transporter , Substratbindeprotein	2,8
Dshi_2014	<i>ugpB</i>	Carbohydrat ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-4,1
Dshi_2254		Polysaccharid Exportprotein	3,6
Dshi_2343		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	-4,7
Dshi_2662		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-6,3

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Transport			
Dshi_2664		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-7,0
Dshi_2667		ABC-Transporter zugehörig	-4,8
Dshi_2670		ABC-Transporter zugehörig	-3,7
Dshi_2671		ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-3,9
Dshi_3003		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,9
Dshi_3153		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	3,6
Dshi_3154		TRAP Dicarboxylat Transporter, Transmembranprotein DctQ	3,3
Dshi_3155		TRAP Dicarboxylat Transporter DctM Untereinheit	2,6
Dshi_3326		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,4
Dshi_3711		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP	-2,2
Stressantwort			
Dshi_0683		Hitzeschockprotein Hsp20	3,3
Dshi_0769	<i>csp</i>	Kälteschockprotein, besitzt DNA-Bindedomäne	4,0
Dshi_1299	<i>ompW</i>	Außenmembranprotein, OmpW-Familie	4,8
Dshi_1338	<i>uspA</i>	UspA-Domäne tragendes Protein	4,3
Dshi_2213		UspA-Domäne tragendes Protein	4,7
Dshi_2796		Hitzeschockprotein Hsp20	13,1
Dshi_2892		Hitzeschockprotein Hsp20	7,5
regulatorische Proteine			
Dshi_0072	<i>rsbW</i>	Putativer Anti-Sigma Regulationsfaktor, Serin/Threonin Proteinkinase	-4,1
Dshi_0212		Transkriptioneller Regulator ChvI, Zwei-Komponentensystem	-2,3
Dshi_0765		Transkriptioneller Regulator, MarR Familie	-5,6
Dshi_0870		Transkriptioneller Regulator, SARP Familie	5,7

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung regulatorische Proteine			
Dshi_1094		Transkriptioneller Regulator, Fis Familie	-4,3
Dshi_1411		Transkriptioneller Regulator, TraR/DksA Familie	5,6
Dshi_1508	<i>ctrA</i>	Transkriptioneller Regulator, Zwei-Komponentensystem	-10,7
Dshi_2631		Antwortregulator, Empfänger Domäne	-6,7
Dshi_2674		Transkriptioneller Regulator, Zwei-Komponentensystem, LuxR Familie	-2,6
Dshi_2820		Antwortregulator, Empfänger Domäne	-7,0
Dshi_2852		Transkriptioneller Regulator, LuxR Familie	-6,6
Dshi_4067		Hypothetisches Protein, vermutlich AHL-abhängiger transkriptioneller Regulator, LuxR Familie	-4,4
PHB-Synthese			
Dshi_2231	<i>phaP</i>	Phasin	2,9
Dshi_2232	<i>phaP</i>	Phasin	3,1
Dshi_2233	<i>phbC</i>	Poly(β)-Hydroxybutyrat-Polymerase	2,9
Dshi_3066	<i>atoB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Acetyl-CoA-Acetyltransferase	3,5
Dshi_3067	<i>fabG</i>	Acetoacetyl-CoA-Reduktase	3,1
Motilität und Chemotaxis			
Dshi_1131	<i>flp</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin Flp	-6,0
Dshi_1132	<i>flp</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin Flp	-6,0
Dshi_1409	<i>fliM</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellenmotor Switch Protein FliM	-3,0
Dshi_1845	<i>fliG</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellenmotor Switch Protein FliG	-3,7
Dshi_3247	<i>flgB</i>	Flagellen-Basalkörperprotein FlgB	-4,1
Dshi_3248	<i>flgC</i>	Flagellen-Basalkörperprotein FlgC	-3,3
Dshi_3249	<i>fliE</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellenhaken-Basalkörperkomplex Protein FliE	-2,9
Dshi_3250	<i>fliQ</i>	Exportprotein FliQ	-3,6

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Motilität und Chemotaxis			
Dshi_3252	<i>flgG</i>	Flagellen-Basalkörperprotein FlgG	-3,7
Dshi_3253	<i>flgA</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellen-Basalkörperprotein P-Ring Bildung FlgA	-3,0
Dshi_3254	<i>flgH</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares L-Ring Protein FlgH	-4,7
Dshi_3255	<i>fliL</i>	Flagellen-Basalkörper-assoziiertes Protein FliL	-4,3
Dshi_3260	<i>motA</i>	Flagellen Motorprotein MotA	-3,9
Dshi_3261	<i>flbB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares Protein FlbB	-3,4
Dshi_3264	<i>fliF</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares M-Ring Protein FliF	-4,8
Dshi_3265	<i>fliH</i>	Putatives Flagellen-Biosynthese Protein FliH	-3,5
Dshi_3266	<i>fliN</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellenmotor Switch Protein FliN	-3,0
Dshi_3267	<i>fliP</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellen-Biosynthese Protein FliP	-3,0
Dshi_3359	<i>flbT</i>	Repressor der Flagellen-Biosynthese FlbT	-3,9
Dshi_3360	<i>flaF</i>	Regulatorisches Protein der Flagellen-Biosynthese FlaF	-4,1
Dshi_3361	<i>fliC</i>	Flagellin Protein FliC	-5,4
Dshi_3376	<i>flgI</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares P-Ring Protein FlgI	-2,6
Dshi_3378	<i>flgK</i>	Flagellen Haken-assoziiertes Protein FlgK	-4,8
Dshi_3379	<i>flgE</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellen Hakenprotein FlgE	-9,7
Dshi_3484		Hypothetisches Protein, vermutlich an Chemotaxis beteiligte Histidinkinase	-3,3
Translation			
Dshi_0265	<i>rplJ</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L10	-4,0
Dshi_0266	<i>rplL</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L7/L12	-5,1
Dshi_0271	<i>rpsL</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S12	-3,6
Dshi_0272	<i>rpsG</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S7	-3,3
Dshi_0273	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	-2,9

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Translation			
Dshi_0275	<i>rpsJ</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S10	-2,7
Dshi_0278	<i>rplW</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L23	-2,9
Dshi_0285		Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L2	-3,8
Dshi_0286	<i>rpsS</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S19	-3,5
Dshi_0287	<i>rplV</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L22	-4,6
Dshi_0289	<i>rplP</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L16	-3,5
Dshi_0296	<i>rplX</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L24	-3,7
Dshi_0297	<i>rplE</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L5	-4,5
Dshi_0298	<i>rpsN</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S14	-4,6
Dshi_0299	<i>rpsH</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S8	-3,9
Dshi_0301	<i>rplR</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L18	-2,9
Dshi_0348	<i>rpsP</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S16	-3,4
Dshi_1549	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor Ts	-5,3
Dshi_1601	<i>rpsI</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S9	-2,9
Dshi_1602	<i>rplM</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L13	-2,9
Dshi_2188	<i>rplI</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L9	-2,6
Dshi_2919	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	-2,8
Elektronentransportkette			
Dshi_0476	<i>gcd</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich PQQ-abhängige Methanol-Dehydrogenase, große Untereinheit	-5,8
Dshi_0948	<i>lldD</i>	L-Lactat-Dehydrogenase	-1,9
Dshi_2663		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c₅₅₀</i>	-10,3
Dshi_2673		Quinoprotein Alkoholdehydrogenase, PQQ-abhängig	-18,0
Dshi_2688		Cytochrom <i>bd</i> Ubiquinol Oxidase Untereinheit I	4,6

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Elektronentransportkette			
Dshi_2694		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i>	4,1
Dshi_2982		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i>	-3,3
Dshi_3276		Cytochrom <i>c</i> ₁ Untereinheit	2,1
Dshi_3547		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i> ₂	-1,8
TypIV Pilus/Sekretion			
Dshi_3638		Lytische katalytische Transglykolase	-5,0
Dshi_3639	<i>virB2</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilus-Untereinheit des TypIV-Sekretionssystems	-6,2
Dshi_3641	<i>virB4</i>	VirB Komponente des TypIV-Sekretionssystems	-7,9
Dshi_3642		Hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>vir</i> -Cluster	-3,1
Dshi_3643		Hypothetisches Protein, vermutlich lytische, katalytische Transglykolase, lokalisiert in <i>vir</i> -Cluster	-4,0
Dshi_3644	<i>virB5</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin des TypIV-Sekretionssystems	-4,8
Dshi_3646	<i>virB9</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Bestandteil des TypIV-Sekretionskanals	-5,0
Dshi_3972		Hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>vir</i> -Cluster	-6,5
Dshi_3974	<i>virB2</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilus-Untereinheit des TypIV-Sekretionssystems	-4,1
Dshi_3975	<i>virB3</i>	Bestandteil des TypIV-Sekretionskanals	-5,7
Dshi_3976	<i>virB2</i>	VirB Komponente des TypIV-Sekretionssystems	-6,7
Dshi_3979	<i>virB5</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Pilin des TypIV-Sekretionssystems	-4,2
Sonstige			
Dshi_0048		Hypothetisches Protein, vermutlich Histidinkinase BaeS	-6,2
Dshi_0068		Hypothetisches Protein, vermutlich Lipoprotein	2,6
Dshi_0073		Anti-Sigmafaktor Antagonist	-5,2
Dshi_0134	<i>pcd</i>	Transkriptioneller Koaktivator/ Pterin-Dehydratase	2,8
Dshi_0284		Hypothetisches Protein, vermutlich Außenmembranprotein	3,2

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Sonstige			
Dshi_0473		S-(Hydroxymethyl)Glutathion-Dehydrogenase	-5,0
Dshi_0474		S-Formylglutathion-Hydrolase	-3,9
Dshi_0617	<i>clpB</i>	ATPase	3,9
Dshi_0621		Hypothetisches Protein, vermutlich Fasciclin	3,3
Dshi_0669	<i>dacC</i>	D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase	2,8
Dshi_0739		Ppx/GppA Phosphatase	3,1
Dshi_0825		AMP-abhängige Synthetase und Ligase	2,8
Dshi_1095		Aldehyd-Dehydrogenase	-5,6
Dshi_1099		Peptid-Methioninsulfoxid-Reduktase	3,0
Dshi_1128		Außenmembranprotein der OmpA Familie	2,6
Dshi_1785	<i>nrdJ</i>	Ribonukleotiddiphosphat-Reduktase, Untereinheit α	-2,8
Dshi_2214		Monooxygenase, involviert in Antibiotika Biosynthese	3,2
Dshi_2285		Hypothetisches Protein, vermutlich Lipoprotein	2,7
Dshi_2295		Amidohydrolase	2,9
Dshi_2340		Ribonuklease	-3,3
Dshi_2367	<i>algP</i>	Alginat, regulatorisches Protein AlgP	4,9
Dshi_2368	<i>ureB</i>	Urease, β -Untereinheit	6,1
Dshi_2369	<i>ureA</i>	Urease, γ -Untereinheit	3,5
Dshi_2388		Glykosyltransferase	-3,7
Dshi_2636		Bacteriochlorophyll 4-Vinyl-Reduktase	2,8
Dshi_2658		Molybdopterin-Dehydrogenase	-9,7
Dshi_2659	<i>coxL</i>	CO-Dehydrogenase, große Untereinheit	-9,6
Dshi_2660	<i>coxS</i>	CO-Dehydrogenase, kleine Untereinheit	-7,2

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Sonstige			
Dshi_2661		CO-Dehydrogenase, Untereinheit G	-5,6
Dshi_2939	<i>clpA</i>	ATP-abhängige Clp Protease, ATP-bindende Untereinheit ClpA	2,9
Dshi_3236	<i>cynT</i>	Carbonat-Dehydratase	3,2
Dshi_3402		Serralysin	-3,2
Dshi_3433		Hypothetisches Protein, PAS-Familie, vermutlich interner Sauerstoffsensor	-5,2
Dshi_3500	<i>comF</i>	Hypothetisches Protein, putatives Kompetenzprotein F	-3,2
Dshi_3841	<i>gdhA</i>	Glutamat-Dehydrogenase	-4,5
Dshi_3877	<i>thiC</i>	Protein der Thiamin-Biosynthese	-4,9
Dshi_4112		<i>Prevent-host-death family</i> Protein	2,7
Dshi_4223		Ferritin, Protein der Dps Familie	3,1
Unbekannt			
Dshi_0086		Hypothetisches Protein	3,3
Dshi_0225		Hypothetisches Protein, vermutlich Antwortregulator, Empfängerdomäne	5,7
Dshi_0282		Hypothetisches Protein	4,4
Dshi_0283		Hypothetisches Protein	2,6
Dshi_0429		Hypothetisches Protein	9,1
Dshi_0430		Hypothetisches Protein	4,5
Dshi_0486		Hypothetisches Protein	-3,7
Dshi_0684		Hypothetisches Protein	3,4
Dshi_0715		Hypothetisches Protein	5,2
Dshi_0750		Hypothetisches Protein	3,5
Dshi_0810		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_0814		Hypothetisches Protein	4,5

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_0816		Hypothetisches Protein	3,4
Dshi_0817		Hypothetisches Protein	3,4
Dshi_0818		Hypothetisches Protein	5,9
Dshi_0819		Hypothetisches Protein	3,1
Dshi_0854		Hypothetisches Protein	-6,3
Dshi_0873		Hypothetisches Protein	2,8
Dshi_1084		Hypothetisches Protein	4,4
Dshi_1122		Hypothetisches Protein	2,9
Dshi_1123		TPR-Repeat enthaltendes Protein	2,8
Dshi_1129		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_1205		Hypothetisches Protein	7,3
Dshi_1364		Hypothetisches Protein	-3,6
Dshi_1412		Hypothetisches Protein	9,7
Dshi_1470		Hypothetisches Protein	-5,6
Dshi_1560		Hypothetisches Protein	7,9
Dshi_1584		Hypothetisches Protein	-3,9
Dshi_1748		Hypothetisches Protein	4,4
Dshi_1770		Hypothetisches Protein	3,7
Dshi_1995		Hypothetisches Protein	2,8
Dshi_2085		Hypothetisches Protein	-4,4
Dshi_2245		Hypothetisches Protein	3,1
Dshi_2308		Hypothetisches Protein	3,1
Dshi_2364		Hypothetisches Protein	7,2

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_2366		Hypothetisches Protein	3,2
Dshi_2620		Hypothetisches Protein	3,6
Dshi_2621		Hypothetisches Protein	5,7
Dshi_2622		Hypothetisches Protein	5,9
Dshi_2625		Hypothetisches Protein	3,2
Dshi_2634		Hypothetisches Protein	-7,5
Dshi_2665		Hypothetisches Protein	-9,7
Dshi_2666		Hypothetisches Protein	-14,6
Dshi_2746		Hypothetisches Protein	6,0
Dshi_2779		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_2870		Hypothetisches Protein	3,3
Dshi_2971		Hypothetisches Protein	3,6
Dshi_3069		Hypothetisches Protein	3,6
Dshi_3152		Hypothetisches Protein	3,3
Dshi_3312		Hypothetisches Protein	-7,0
Dshi_3636		Hypothetisches Protein	-4,1
Dshi_3637		Hypothetisches Protein	-7,3
Dshi_3667		Hypothetisches Protein	3,3
Dshi_3666		Hypothetisches Protein	5,5
Dshi_3668		Hypothetisches Protein	3,4
Dshi_3713		Hypothetisches Protein	3,2
Dshi_3756		Hypothetisches Protein	2,9
Dshi_3929		Hypothetisches Protein	3,1

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_3966		Hypothetisches Protein	-4,8
Dshi_4154		Hypothetisches Protein, vermutlich Metallo- β -Lactamase Familie	-4,3
Dshi_4155		Hypothetisches Protein	-4,4

Tabelle A-3. Regulierte Gene in *D. shibae* unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin und Lichtausschluss. Beschrieben sind der Genlokus sowie dessen Genname, sofern vergeben. Weiterhin aufgeführt ist das jeweilige Genprodukt sowie der Faktor der Genexpressionsänderung, der *Fold Change* (FC). Als Grenzwert für die differentielle Expression eines Gens wurde ein FC von $\pm 2,6$ festgelegt. Zusätzlich aufgeführt sind einige Gene, deren FC unter diesem Grenzwert lag, wenn die von ihnen kodierten Proteine in ihrer Funktion in Kontext mit signifikant regulierten Genen standen. Hierbei betrug der FC jedoch niemals weniger als 2,0. Gene, deren Promotoren eine Fnr-Bindestelle besitzen, sind grau unterlegt.

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Denitrifikation			
Dshi_2304		Protein mit Hemerythrin HHE Kationen-Bindedomäne, vermutlich NO-abhängiger Regulator DnrN oder NorA	2,9
Dshi_3160		Hypothetisches Protein, lokalisiert in Nap-Cluster	3,3
Dshi_3161	<i>napC</i>	Cytochrom <i>c</i> -Typ Protein, NapC	2,9
Dshi_3168	<i>nosX</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich NosX: Protein für die Reifung der N ₂ O-Reduktase	7,2
Dshi_3169	<i>cycA</i>	Cytochrom <i>c</i> , Klasse I	12,0
Dshi_3170	<i>nnrU</i>	Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit NnrU	2,4
Dshi_3171	<i>cbiX</i>	Cobalamin-Biosynthese	3,8
Dshi_3172	<i>nirN</i>	Cytochrom <i>d_I</i> , besitzt Häm-Binderegion	4,9
Dshi_3173	<i>nirJ</i>	Radical SAM Domäne-tragendes Protein	5,1
Dshi_3174	<i>nirH</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,8
Dshi_3175	<i>nirG</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,2
Dshi_3176	<i>nirD</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,4
Dshi_3177	<i>nirF</i>	Cytochrom <i>d_I</i> Häm-Region	6,3
Dshi_3178	<i>nirC</i>	Hypothetisches Protein, putative Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase	6,3
Dshi_3179	<i>nirE</i>	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	8,7
Dshi_3180	<i>nirS</i>	Cytochrom <i>cd_I</i> Nitritreduktase	24,4
Dshi_3181	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	4,1
Dshi_3182	<i>nnrS</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich an NO-Abbau beteiligtes Protein NnrS	3,2
Dshi_3183	<i>norC</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, kleine Untereinheit	
Dshi_3184	<i>norB</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase	15,9

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Denitrifikation			
Dshi_3185	<i>norQ</i>	ATPase	9,1
Dshi_3186	<i>norD</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, Aktivierungsprotein	7,2
Dshi_3187	<i>norE</i>	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit III	2,5
Dshi_3188	<i>norF</i>	Putatives NO-Reduktase Protein NorF	2,4
Dshi_3189	<i>dnrD</i>	Transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	2,0
Dshi_3191	<i>dnr</i>	Transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	5,1
Dshi_3192		Hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>nos</i> -Cluster	8,3
Dshi_3193	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	4,8
Dshi_3194	<i>nosZ</i>	Distickstoffmonoxid-Reduktase	11,4
Dshi_3195	<i>nosD</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifungsprotein NosD	3,3
Dshi_3196	<i>nosF</i>	ABC-Transporter zugehörig	3,0
Dshi_3197	<i>nosY</i>	NO-Reduktase Protein NosY	2,2
Dshi_3198	<i>nosL</i>	Protein der NosL Familie	3,0
Dshi_3199	<i>nosD</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifung, periplasmatisches Protein NosD	2,6
Arginin-Fermentation			
Dshi_0431	<i>arcD</i>	Anaerober Arginin-Ornithin-Antiporter	2,4
Dshi_0432	<i>arcA</i>	Arginin-Deiminase	3,6
Dshi_0433	<i>arcB</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	2,7
Dshi_0434	<i>arcC</i>	Carbamat-Kinase	2,0
Porphyrin- und Chlorophyll- Metabolismus			
Dshi_0161	<i>cbtA</i>	Cobalt-Tranporter, Untereinheit CbtA	2,2
Dshi_0162	<i>cbtB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Cobalt-Tranporter, Untereinheit CbtB	2,3
Dshi_0541	<i>hemN1</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	3,0

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Porphyrin- und Chlorophyll- Metabolismus			
Dshi_0659	<i>hemN2</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	2,7
Dshi_2637	<i>bchE</i>	Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylester anaerobe oxidative Cyclase	4,2
Dshi_3190	<i>hemA</i>	5-Aminolävulinatsynthase	8,4
Transport			
Dshi_1533		Phosphat ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-3,0
Dshi_2021		Eisen ABC-Transporter, Substratbindeprotein	3,1
Dshi_2343		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	-2,8
Dshi_2662		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-3,4
Dshi_2664		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-5,3
Dshi_2667		ABC-Transporter zugehörig	-5,8
Dshi_2671		ABC-Transporter, Substratbindeprotein	-2,7
Dshi_3153		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	2,1
Dshi_3154		TRAP Dicarboxylat Transporter, Transmembranprotein DctQ	2,0
Stressantwort			
Dshi_1299	<i>ompW</i>	Außenmembranprotein, OmpW-Familie	5,9
Dshi_1338	<i>uspA</i>	UspA-Domäne tragendes Protein	5,5
Dshi_2213		UspA-Domäne tragendes Protein	4,0
Dshi_2686		UspA-Domäne tragendes Protein	3,0
Dshi_2796		Hitzeschockprotein Hsp20	12,0
Dshi_2892		Hitzeschockprotein Hsp20	5,7
regulatorische Proteine			
Dshi_0812		Transkriptioneller Regulator, TraR/DksA Familie	2,9
Dshi_1094		Transkriptioneller Regulator, Fis Familie	-2,1

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
regulatorische Proteine			
Dshi_1411		Transkriptioneller Regulator, TraR/DksA Familie	4,9
Dshi_2306		Transkriptioneller Regulator BadM/Rrf2 Familie	2,7
Dshi_2674		Transkriptioneller Regulator, Zwei-Komponentensystem, LuxR Familie	-3,4
Dshi_2852		Transkriptioneller Regulator, LuxR Familie	-1,8
Motilität und Chemotaxis			
Dshi_1131		Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares Protein	-3,3
Dshi_1132		Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares Protein	-3,7
Dshi_3359	<i>flbT</i>	Repressor der Flagellen-Biosynthese FlbT	-2,0
Dshi_3361	<i>fliC</i>	Flagellin Protein FliC	2,6
Translation			
Dshi_0260	<i>rplK</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L11	-2,0
Dshi_0265	<i>rplJ</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L10	-1,9
Dshi_0266	<i>rplL</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L7/L12	-2,6
Dshi_0271	<i>rpsL</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S12	-2,0
Dshi_0273	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor G	-2,0
Dshi_0275	<i>rpsJ</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S10	-2,0
Dshi_0277	<i>rplD</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L4	-1,9
Dshi_0286	<i>rpsS</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S19	-1,8
Dshi_0287	<i>rplV</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L22	-1,9
Dshi_0296	<i>rplX</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L24	-2,0
Dshi_0297	<i>rplE</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L5	-2,3
Dshi_0299	<i>rpsH</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S8	-1,9
Dshi_0348	<i>rpsP</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S16	-3,7

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Translation			
Dshi_1601	<i>rpsI</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S9	-1,9
Dshi_2187	<i>rpsR</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S18	-2,3
Elektronentransportkette			
Dshi_0476	<i>gcd</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich PQQ-abhängige Methanol-Dehydrogenase, große Untereinheit	-3,7
Dshi_0948	<i>LldD</i>	L-Lactat-Dehydrogenase	-2,1
Dshi_2663		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c₅₅₀</i>	-7,5
Dshi_2673		Quinoprotein Alkoholdehydrogenase, PQQ-abhängig	-3,3
Dshi_2694		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i>	3,8
Dshi_2982		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i>	-2,6
Dshi_3547	<i>cycA</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c₂</i>	-1,8
Photosynthese			
Dshi_2636		Bacteriochlorophyll 4-Vinylreduktase	2,2
Dshi_2899		Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	2,3
Dshi_2900	<i>pucB</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	2,7
Dshi_3518	<i>bchY</i>	Chlorophyllid-Reduktase Untereinheit Y	2,5
Dshi_3521	<i>pufB</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	3,6
Dshi_3522	<i>pufA</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	3,8
Dshi_3540	<i>puhA</i>	Photosynthetisches Reaktionszentrum, Untereinheit H	2,0
Dshi_3541	<i>puhB</i>	Protein für den Aufbau des photosynthetischen Komplexes	2,1
Sonstige			
Dshi_0048		Hypothetisches Protein, vermutlich Histidinkinase BaeS	-2,5
Dshi_0473		S-(Hydroxymethyl)-Glutathion-Dehydrogenase	-3,7
Dshi_0474		S-Formylglutathion-Hydrolase	-2,7

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Sonstige			
Dshi_0617	<i>clpB</i>	ATPase	3,6
Dshi_0739		Ppx/GppA Phosphatase	2,6
Dshi_0751	<i>ppk2</i>	Polyphosphatkinase 2	3,5
Dshi_1095		Aldehyd-Dehydrogenase	-3,3
Dshi_2340		Ribonuklease	-2,0
Dshi_2367	<i>algP</i>	Alginat, regulatorisches Protein AlgP	2,0
Dshi_2368	<i>ureB</i>	Urease, β -Untereinheit	2,6
Dshi_2658		Molybdopterin Dehydrogenase	-2,8
Dshi_2659	<i>coxL</i>	CO-Dehydrogenase, große Untereinheit	-4,2
Dshi_2660	<i>coxS</i>	CO-Dehydrogenase, kleine Untereinheit	-3,9
Dshi_2661		CO-Dehydrogenase, Untereinheit G	-2,3
Dshi_3402		Serralysin	-2,0
Dshi_3532	<i>ppaA</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Sauerstoff-und Lichtsensor PpaA-PpsR	-1,8
Dshi_3841	<i>gdhA</i>	Glutamat-Dehydrogenase	-2,3
Dshi_3877	<i>thiC</i>	Protein der Thiamin-Biosynthese	-2,4
Unbekannt			
Dshi_0022		Hypothetisches Protein	3,9
Dshi_0225		Hypothetisches Protein, vermutlich Antwortregulator, Empfängerdomäne	3,1
Dshi_0429		Hypothetisches Protein	4,7
Dshi_0430		Hypothetisches Protein	3,3
Dshi_0486		Hypothetisches Protein	-2,2
Dshi_0715		Hypothetisches Protein	6,7
Dshi_0750		Hypothetisches Protein	1,3

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_0814		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_0816		Hypothetisches Protein	2,9
Dshi_0818		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_1205		Hypothetisches Protein	2,5
Dshi_1412		Hypothetisches Protein	5,9
Dshi_1454		Hypothetisches Protein	5,9
Dshi_1560		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_1584		Hypothetisches Protein	-2,5
Dshi_1748		Hypothetisches Protein	2,1
Dshi_2085		Hypothetisches Protein	-2,0
Dshi_2308		Hypothetisches Protein	2,2
Dshi_2364		Hypothetisches Protein	3,0
Dshi_2621		Hypothetisches Protein	3,5
Dshi_2622		Hypothetisches Protein	3,6
Dshi_2634		Hypothetisches Protein	-5,2
Dshi_2665		Hypothetisches Protein	-7,4
Dshi_2666		Hypothetisches Protein	-6,3
Dshi_2746		Hypothetisches Protein	2,0
Dshi_3306		Hypothetisches Protein	3,0
Dshi_3312		Hypothetisches Protein	-2,8
Dshi_3666		Hypothetisches Protein	2,2
Dshi_4130		Hypothetisches Protein	-1,9
Dshi_4154		Hypothetisches Protein, vermutlich Metallo- β -Lactamase Familie	-2,8

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_4155		Hypothetisches Protein	-4,1
Dshi_4222		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_4224		Hypothetisches Protein	5,6
Dshi_4225		Hypothetisches Protein	4,2

Tabelle A-4. Regulierte Gene in *D. shibae* unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin und einer definierten Menge Licht. Beschrieben sind der Genlokus sowie dessen Genname, sofern vergeben. Weiterhin aufgeführt ist das jeweilige Genprodukt sowie der Faktor der Genexpressionsänderung, der *Fold Change* (FC). Als Grenzwert für die differentielle Expression eines Gens wurde ein FC von $\pm 2,6$ festgelegt. Zusätzlich aufgeführt sind einige Gene, deren FC unter diesem Grenzwert lag, wenn die von ihnen kodierten Proteine in ihrer Funktion in Kontext mit signifikant regulierten Genen standen. Hierbei betrug der FC jedoch niemals weniger als 2,0. Gene, deren Promotoren eine Fnr-Bindestelle besitzen, sind grau unterlegt.

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Denitrifikation			
Dshi_0686	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	-2,7
Dshi_3165	<i>napA</i>	Periplasmatische Nitratreduktase, katalytische Untereinheit	-2,8
Dshi_3167	<i>napF</i>	Periplasmatische Nitratreduktase, Ferredoxin-Typ Protein NapF	-2,9
Dshi_3168	<i>nosX</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich NosX: Protein für die Reifung der N ₂ O-Reduktase	5,6
Dshi_3169	<i>cycA</i>	Cytochrom <i>c</i> , Klasse I	6,5
Dshi_3170	<i>nnrU</i>	Hypothetisches Protein, Ähnlichkeit mit NnrU	2,1
Dshi_3171	<i>cbiX</i>	Cobalamin-Biosynthese	3,2
Dshi_3172	<i>nirN</i>	Cytochrom <i>d₁</i> , besitzt Häm-Binderegion	3,2
Dshi_3173	<i>nirJ</i>	Radical SAM Domäne-tragendes Protein	5,3
Dshi_3174	<i>nirH</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	6,4
Dshi_3175	<i>nirG</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	5,9
Dshi_3176	<i>nirD</i>	Transkriptioneller Regulator, AsnC Familie	2,7
Dshi_3177	<i>nirF</i>	Cytochrom <i>d₁</i> Häm-Binderegion	4,1
Dshi_3178	<i>nirC</i>	Hypothetisches Protein, putative Cytochrom <i>c</i> Nitritreduktase	3,9
Dshi_3179	<i>nirE</i>	Uroporphyrin-III C-Methyltransferase	5,7
Dshi_3180	<i>nirS</i>	Cytochrom <i>cd₁</i> Nitritreduktase	17,5
Dshi_3181	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	4,2
Dshi_3182	<i>nnrS</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich an NO-Abbau beteiligtes Protein NnrS	2,9
Dshi_3183	<i>norC</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, kleine Untereinheit	14,9
Dshi_3184	<i>norB</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase	11,5

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Denitrifikation			
Dshi_3185	<i>norQ</i>	ATPase	6,5
Dshi_3186	<i>norD</i>	Stickstoffmonoxid-Reduktase, Aktivierungsprotein	6,5
Dshi_3187	<i>norE</i>	Cytochrom <i>c</i> Oxidase Untereinheit III	2,6
Dshi_3191	<i>dnr</i>	Transkriptioneller Regulator, Crp/Fnr Familie	4,1
Dshi_3192		Hypothetisches Protein, lokalisiert in <i>nos</i> -Cluster	6,4
Dshi_3193	<i>nosR</i>	Hypothetisches Protein, putativer transkriptioneller Regulator der NO-Reduktase	2,6
Dshi_3194	<i>nosZ</i>	Distickstoffmonoxid-Reduktase	8,3
Dshi_3195	<i>nosD</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifungsprotein NosD	2,3
Dshi_3196	<i>nosF</i>	ABC-Transporter zugehörig	2,6
Dshi_3197	<i>nosY</i>	NO-Reduktase Protein NosY	2,3
Dshi_3198	<i>nosL</i>	Protein der NosL Familie	2,0
Dshi_3199	<i>nosD</i>	Hypothetisches Protein, NO-Reduktase Reifung, periplasmatisches Protein NosD	2,2
Arginin Fermentation			
Dshi_0431	<i>arcD</i>	Anaerober Arginin-Ornithin-Antiporter	5,3
Dshi_0432	<i>arcA</i>	Arginin-Deiminase	7,0
Dshi_0433	<i>arcB</i>	Ornithin-Carbamoyltransferase	5,2
Dshi_0434	<i>arcC</i>	Carbamat-Kinase	2,6
Porphyrin und Chlorophyll Metabolismus			
Dshi_0541	<i>hemN1</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	2,3
Dshi_0659	<i>hemN2</i>	Coproporphyrinogen III Oxidase, sauerstoffunabhängig	1,9
Dshi_2637	<i>bchE</i>	Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylester anaerobe oxidative Cyclase	2,3
Dshi_3190	<i>hemA</i>	5-Aminolävulinatsynthase	4,9

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Transport			
Dshi_0390	<i>rbsB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Zucker ABC-Transporter, periplasmatisches Bindepotein	-2,9
Dshi_0547	<i>ugpB</i>	Extrazelluläres Solut-Bindeprotein	-3,6
Dshi_1194		TRAP Transporter, 4 TM / 12 TM Fusionsprotein	-2,6
Dshi_1195		TRAP Transporter Solut Rezeptor	-3,7
Dshi_1652	<i>algE</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Substratbindepotein des α -Glucosid Transportsystems	-3,6
Dshi_2014	<i>ugpB</i>	Carbohydrat ABC-Transporter, Substratbindepotein	-3,2
Dshi_2343		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	-3,8
Dshi_2662		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindepotein	-6,0
Dshi_2664		Aminosäure ABC-Transporter, Substratbindepotein	-5,7
Dshi_2667		ABC-Transporter zugehörig	-5,8
Dshi_2670		ABC-Transporter zugehörig	-3,9
Dshi_2671		ABC-Transporter, Substratbindepotein	-3,6
Dshi_3153		TRAP Dicarboxylat Transporter, DctP Untereinheit	3,1
Dshi_3154		TRAP Dicarboxylat Transporter, Transmembranprotein DctQ	3,3
Stressantwort			
Dshi_0683		Hitzeschockprotein Hsp20	2,1
Dshi_1338	<i>uspA</i>	UspA-Domäne tragendes Protein	4,9
Dshi_2213		UspA-Domäne tragendes Protein	2,0
Dshi_2796		Hitzeschockprotein Hsp20	5,0
regulatorische Proteine			
Dshi_0072	<i>rsbW</i>	Putativer Anti-Sigma Regulationsfaktor, Serin/Threonin Proteinkinase	-4,3
Dshi_0212		Transkriptioneller Regulator ChvI, Zwei-Komponentensystem	-3,3

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung regulatorische Proteine			
Dshi_0765		Transkriptioneller Regulator, MarR Familie	-5,2
Dshi_1094		Transkriptioneller Regulator, Fis Familie	-4,2
Dshi_1411		Transkriptioneller Regulator, TraR/DksA Familie	2,5
Dshi_1508	<i>ctrA</i>	Transkriptioneller Regulator, Zwei-Komponentensystem	-5,0
Dshi_2631		Antwortregulator, Empfänger Domäne	-5,4
Dshi_2674		Transkriptioneller Regulator, Zwei-Komponentensystem, LuxR Familie	-2,9
Dshi_2820		Antwortregulator, Empfänger Domäne	-3,7
Dshi_2852		Transkriptioneller Regulator, LuxR Familie	-3,6
Dshi_4067		Hypothetisches Protein, möglicherweise transkriptioneller Regulator, LuxR-Familie	-4,4
Motilität und Chemotaxis			
Dshi_1131		Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares Protein	-5,6
Dshi_1132		Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares Protein	-5,4
Dshi_1409	<i>fliM</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellenmotor Switch Protein FliM	-3,1
Dshi_1845	<i>fliG</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Flagellenmotor Switch Protein FliG	-3,6
Dshi_3247	<i>flgB</i>	Flagellen-Basalkörperprotein FlgB	-4,0
Dshi_3248	<i>flgC</i>	Flagellen-Basalkörperprotein FlgC	-3,45
Dshi_3249	<i>fliE</i>	Flagellen-Basalkörper-assoziiertes Protein FliE	-3,0
Dshi_3250	<i>fliQ</i>	Exportprotein FliQ	-3,6
Dshi_3252	<i>flgG</i>	Flagellen-Basalkörperprotein FlgG	-3,5
Dshi_3253	<i>flgA</i>	Flagellen-Basalkörperprotein, P-Ring Bildung FlgA	-3,0
Dshi_3254	<i>flgH</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares L-Ring Protein FlgH	-3,8
Dshi_3255	<i>fliL</i>	Flagellen-Basalkörper-assoziiertes Protein FliL	-4,0
Dshi_3260	<i>motA</i>	Flagellen Motorprotein MotA	-4,3

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Motilität und Chemotaxis			
Dshi_3261	<i>flbB</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich flagellares Protein FlbB	-3,4
Dshi_3263	<i>fliL</i>	Flagellenkörper assoziiertes Protein FliL	-2,7
Dshi_3264	<i>fliF</i>	hypothetisches Protein, vermutlich flagellares M-Ring Protein FliF	-4,3
Dshi_3265	<i>fliH</i>	Putatives Flagellen-Biosynthese Protein FliH	-3,3
Dshi_3266	<i>fliN</i>	Flagellenmotor Switch Protein FliN	-2,9
Dshi_3267	<i>fliP</i>	Protein der Flagellen-Biosynthese FliP	-2,9
Dshi_3359	<i>flbT</i>	Repressor der Flagellen-Biosynthese FlbT	-3,2
Dshi_3360	<i>flaF</i>	Regulatorisches Protein der Flagellen-Biosynthese FlaF	-4,1
Dshi_3361	<i>fliC</i>	Flagellin Protein FliC	-5,1
Dshi_3363	<i>flgJ</i>	Putatives flagellares Protein FlgJ	-4,4
Dshi_3378	<i>flgK</i>	Flagellen Haken-assoziiertes Protein FlgK	-4,5
Dshi_3484		Hypothetisches Protein, vermutlich an Chemotaxis beteiligte Histidinkinase	-3,2
Translation			
Dshi_0265	<i>rplJ</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 10	-3,8
Dshi_0266	<i>rplL</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 7/L 12	-4,2
Dshi_0275	<i>rpsJ</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S10	-2,6
Dshi_0278	<i>rplW</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 23	-2,9
Dshi_0289	<i>rplP</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 16	-2,7
Dshi_0290	<i>rplN</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 14	-2,8
Dshi_0296	<i>rplX</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 24	-2,8
Dshi_0297	<i>rplE</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 5	-2,9
Dshi_0298	<i>rpsN</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S 14	-2,8
Dshi_0299	<i>rpsH</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S 8	-2,8

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Translation			
Dshi_0300	<i>rplF</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 6	-2,9
Dshi_0301	<i>rplR</i>	Ribosomales Protein der 50S-Untereinheit L 18	-2,7
Dshi_0348	<i>rpsP</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S 16	-3,6
Dshi_1601	<i>rpsI</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit S 9	-3,0
Elektronentransportkette			
Dshi_0476	<i>gcd</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich PQQ-abhängige Methanol-Dehydrogenase, große Untereinheit	-4,8
Dshi_0948	<i>LldD</i>	L-Lactat-Dehydrogenase	-2,6
Dshi_2663		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i> ₅₅₀	-10,3
Dshi_2672		Cytochrom <i>c</i> ₂	-3,6
Dshi_2673		Quinoprotein Alkohol-Dehydrogenase, PQQ-abhängig	-11,4
Dshi_2982		Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i>	-2,9
Dshi_3547	<i>cycA</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Cytochrom <i>c</i> ₂	-2,0
Photosynthese			
Dshi_2636		Bacteriochlorophyll 4-Vinylreduktase	2,9
Dshi_3518	<i>bchY</i>	Chlorophyllid-Reduktase Untereinheit Y	1,9
Dshi_3521	<i>pufB</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	2,0
Dshi_3522	<i>pufA</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	1,9
Dshi_3540	<i>puhA</i>	Photosynthetisches Reaktionszentrum, Untereinheit H	2,1
Dshi_3541	<i>puhB</i>	Protein für den Aufbau des photosynthetischen Komplexes	2,0
Sonstige			
Dshi_0048		Hypothetisches Protein, vermutlich Histidinkinase BaeS	-4,2
Dshi_0073		Anti-Sigmafaktor Antagonist	-4,7
Dshi_0435	<i>atpD</i>	ATP Synthase β Untereinheit	2,7

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Sonstige			
Dshi_0440	<i>atpE</i>	F0F1-Typ ATP Synthase	3,1
Dshi_0441	<i>atpF</i>	ATP Synthase Untereinheit <i>b_f</i>	2,9
Dshi_0473		S-(Hydroxymethyl)-Glutathion-Dehydrogenase	-4,9
Dshi_0474		S-Formylglutathion-Hydrolase	-3,8
Dshi_0739		Ppx/GppA Phosphatase	1,8
Dshi_1095		Aldehyd-Dehydrogenase	-5,2
Dshi_1399	<i>acsA</i>	Acetat-CoA-Ligase	-3,8
Dshi_1643	<i>recA</i>	DNA Rekombinations- und Reparaturprotein RecA	-3,2
Dshi_1644		Integrale Membran Sensor Hybrid Histidinkinase	-2,7
Dshi_2082		Hypothetisches Protein, putative L-Sorbose-Dehydrogenase	-3,9
Dshi_2340		Ribonuklease	-2,1
Dshi_2388		Glykosyltransferase	-3,2
Dshi_2658		Molybdopterin-Dehydrogenase	-6,5
Dshi_2659	<i>coxL</i>	CO-Dehydrogenase, große Untereinheit	-6,5
Dshi_2660	<i>coxS</i>	CO-Dehydrogenase, kleine Untereinheit	-6,3
Dshi_2661		CO-Dehydrogenase, Untereinheit G	-4,4
Dshi_2878		Succinyl-CoA-Synthetase, β -Untereinheit	-4,1
Dshi_2978	<i>rpoH2</i>	RNA Polymerase Sigma-32 Untereinheit	2,7
Dshi_2981		Sulfitoxidase	-2,8
Dshi_2997	<i>pnp</i>	Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase	-3,0
Dshi_3332		Histidinkinase, Antwortregulator	-3,1
Dshi_3402		Serralysin	-3,5
Dshi_3426		S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase	-3,4

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Sonstige			
Dshi_3433		Hypothetisches Protein, PAS-Familie, vermutlich interner Sauerstoffsensor	-4,3
Dshi_3485		Serin Phosphatase, Antwortregulator	-3,0
Dshi_3500	<i>comF</i>	Hypothetisches Protein, putatives Kompetenzprotein F	-3,2
Dshi_3553	<i>acs</i>	Acetat-CoA-Ligase	-4,0
Dshi_3569	<i>radC</i>	DNA Reparaturprotein RadC	-3,1
Dshi_3841	<i>gdhA</i>	Glutamat-Dehydrogenase	-3,0
Dshi_3877	<i>thiC</i>	Protein der Thiamin-Biosynthese	-3,1
Dshi_4074		Transposase	-3,3
Unbekannt			
Dshi_0022		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_0429		Hypothetisches Protein	6,5
Dshi_0430		Hypothetisches Protein	6,8
Dshi_0559		Hypothetisches Protein	4,1
Dshi_0561		Hypothetisches Protein	3,7
Dshi_0715		Hypothetisches Protein	2,0
Dshi_0750		Hypothetisches Protein	1,9
Dshi_0774		Hypothetisches Protein	-2,7
Dshi_0816		Hypothetisches Protein	2,6
Dshi_0818		Hypothetisches Protein	2,3
Dshi_0854		Hypothetisches Protein	2,8
Dshi_1205		Hypothetisches Protein	2,6
Dshi_1364		Hypothetisches Protein	3,0
Dshi_1412		Hypothetisches Protein	3,7

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_1454		Hypothetisches Protein	5,3
Dshi_1470		Hypothetisches Protein	-3,7
Dshi_1483		Hypothetisches Protein	-3,3
Dshi_1560		Hypothetisches Protein	3,2
Dshi_1582		Hypothetisches Protein, möglicherweise an Transport beteiligt	-3,2
Dshi_1584		Hypothetisches Protein	-4,0
Dshi_1622		Hypothetisches Protein , putative Hämolysin Vorstufe	-2,9
Dshi_1699		Hypothetisches Protein, vermutlich Außenmembranprotein	2,9
Dshi_1748		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_1783		Hypothetisches Protein	6,1
Dshi_2085		Hypothetisches Protein	-3,1
Dshi_2364		Hypothetisches Protein	2,4
Dshi_2621		Hypothetisches Protein	2,1
Dshi_2622		Hypothetisches Protein	2,2
Dshi_2634		Hypothetisches Protein	-6,3
Dshi_2635		Pentapeptid Repeat Protein	-3,3
Dshi_2665		Hypothetisches Protein	-8,0
Dshi_2666		Hypothetisches Protein	-9,4
Dshi_2746		Hypothetisches Protein	2,6
Dshi_2815		Hypothetisches Protein, besitzt Häm NO-Bindedomäne	-2,9
Dshi_3259		Hypothetisches Protein	-2,8
Dshi_3262		Hypothetisches Protein	-3,6
Dshi_3306		Hypothetisches Protein	2,2

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_3312		Hypothetisches Protein	-6,6
Dshi_3652		Hypothetisches Protein	2,6
Dshi_3666		Hypothetisches Protein	1,8
Dshi_3929		Hypothetisches Protein	3,4
Dshi_4130		Hypothetisches Protein	-2,2
Dshi_4154		Hypothetisches Protein, vermutlich Metallo- β -Lactamase Familie	-3,7
Dshi_4155		Hypothetisches Protein	-3,7
Dshi_4222		Hypothetisches Protein	2,2
Dshi_4224		Hypothetisches Protein	2,7
Dshi_4225		Hypothetisches Protein	2,9

Tabelle A-5. Regulierte Gene in *D. shibae* unter fermentativen Bedingungen mit 10 mM Arginin unter Lichtausschluss verglichen mit dem Wachstum mit einer definierten Lichtmenge. Beschrieben sind der Genlokus sowie dessen Genname, sofern vergeben. Weiterhin aufgeführt ist das jeweilige Genprodukt sowie der Faktor der Genexpressionsänderung, der *Fold Change* (FC). Als Grenzwert für die differentielle Expression eines Gens wurde ein FC von $\pm 2,6$ festgelegt. Zusätzlich aufgeführt sind einige Gene, deren FC unter diesem Grenzwert lag, wenn die von ihnen kodierten Proteine in ihrer Funktion in Kontext mit signifikant regulierten Genen standen. Hierbei betrug der FC jedoch niemals weniger als 2,0. Gene deren Promotoren eine Fnr-Bindestelle besitzen, sind grau unterlegt.

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Porphyrin und Chlorophyll Metabolismus			
Dshi_2636		Bacteriochlorophyll 4-Vinylreduktase	3,8
Dshi_2637	<i>bchE</i>	Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylester, anaerobe oxidative Cyclase	6,8
Dshi_2705	<i>hemE</i>	Uroporphyrinogen Decarboxylase	3,5
Dshi_2897		Hypothetisches Protein, vermutlich an Bildung des Antennenkomplexes beteiligt	2,9
Dshi_2898	<i>pucC</i>	Protein zur Bildung des Antennenkomplexes, PucC	3,4
Dshi_2899		Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	7,3
Dshi_2900	<i>pucB</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit, PucB	9,4
Dshi_3501	<i>crtA</i>	Spheroiden Monooxygenase	2,9
Dshi_3502	<i>bchI</i>	Magnesiumchelatase Untereinheit I	3,0
Dshi_3514	<i>crtE</i>	Polyprenyl-Synthetase	2,9
Dshi_3516	<i>bchC</i>	Protein der Chlorophyllsynthese, BchC	3,4
Dshi_3517	<i>bchX</i>	Chlorophyllid Reduktase Untereinheit X	5,6
Dshi_3518	<i>bchY</i>	Chlorophyllid Reduktase Untereinheit Y	9,1
Dshi_3519	<i>bchZ</i>	Chlorophyllid Reduktase Untereinheit Z	5,5
Dshi_3520	<i>pufQ</i>	Cytochrom Untereinheit PufQ	6,9
Dshi_3521	<i>pufB</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	11,7
Dshi_3522	<i>pufA</i>	Antennenkomplex, α/β -Untereinheit	7,4
Dshi_3523	<i>pufL</i>	Photosynthese Reaktionszentrum, Untereinheit L	6,3
Dshi_3524	<i>pufM</i>	Photosynthese Reaktionszentrum Untereinheit M	5,0

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Porphyrin und Chlorophyll Metabolismus			
Dshi_3525	<i>pufC</i>	Photosynthese Reaktionszentrum, Cytochrom <i>c</i> Untereinheit	6,2
Dshi_3528	<i>bchP</i>	Geranylgeranyl-Reduktase	3,2
Dshi_3530	<i>bchG</i>	Bacteriochlorophyll-Synthase	2,7
Dshi_3533	<i>bchF</i>	2-Vinyl Bacteriochlorophyllid-Hydratase	4,3
Dshi_3534	<i>bchN</i>	Lichtunabhängige Protochlorophyllid-Reduktase, Untereinheit N	3,1
Dshi_3537	<i>chlL</i>	Protochlorophyllid-Reduktase, ATP-Bindeprotein	4,3
Dshi_3538	<i>bchM</i>	Magnesium-Protoporphyrin IX Methyltransferase	3,4
Dshi_3539	<i>lhaA</i>	Protein zur Bildung des Antennenkomplexes, PucC	2,8
Dshi_3540	<i>puhA</i>	Photosynthese Reaktionszentrum, Untereinheit H	5,9
Dshi_3541	<i>puhB</i>	Protein zur Bildung des Photosynthesekomplexes	4,4
Dshi:3542	<i>puhC</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich beteiligt an Bildung des Photosyntheseapparates	3,4
Dshi_3544	<i>acsF</i>	Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylestercyclase	3,5
Dshi_3546	<i>hemA</i>	5-Aminolävulinatsynthase	4,4
Stressantwort			
Dshi_2796		Hitzeschockprotein Hsp20	-2,8
Sonstige			
Dshi_1699		Hypothetisches Protein, vermutlich Außenmembranprotein	3,4
Dshi_2115	<i>soxA</i>	Sarcosin-Oxidase α -Untereinheit	-2,8
Dshi_2396	<i>ilvC</i>	Ketolsäure-Reduktoisomerase	3,5
Dshi_3532	<i>ppaA</i>	Hypothetisches Protein, vermutlich Sauerstoff-und Lichtsensor PpaA-PpsR	2,9
Unbekannt			
Dshi_1783		Hypothetisches Protein	7,5
Dshi_2782		Hypothetisches Protein	3,1

Genlokus	Genname	Genprodukt	FC
Fortsetzung Unbekannt			
Dshi_3543		Hypothetisches Protein	3,4